

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES TOUROS NA IATF:
CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E SUAS RELAÇÕES COM
AS TAXAS DE FERTILIDADE A CAMPO**

Letícia Zoccolaro Oliveira

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES TOUROS NA IATF:
CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E SUAS RELAÇÕES COM
AS TAXAS DE FERTILIDADE A CAMPO**

Letícia Zoccolaro Oliveira

Orientador: Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Co-orientadores: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

Profa. Dra. Ricarda Maria dos Santos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2012

O48u Oliveira, Leticia Zoccolaro
Utilização de diferentes touros na IATF: características seminais e suas relações com as taxas de fertilidade a campo. / Leticia Zoccolaro Oliveira. -- Jaboticabal, 2012
xxii, 193 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima
Banca examinadora: Ed Hoffman Madureira, Sony Dimas Bicudo, Eneiva Carla Carvalho Celeghini, Gisele Zoccal Mingoti
Bibliografia

1. Características espermáticas. 2. Fertilidade do touro. 3. IATF. 4. Sequência de Inseminação. 5. Taxa de concepção. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU: 619:612.6:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES TOUROS NA IATF: CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E SUAS RELAÇÕES COM AS TAXAS DE FERTILIDADE A CAMPO

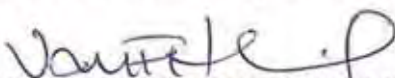
AUTORA: LETICIA ZOCCOLARO OLIVEIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. RUBENS PAES ARRUDA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. RICARDA MARIA DOS SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



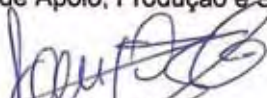
Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



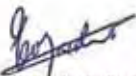
Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Odontologia de Araçatuba



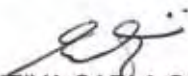
Prof. Dr. SONY DIMAS BICUDO

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu



Prof. Dr. ED HOFFMANN MADUREIRA

Departamento de Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / Pirassununga/SP



Profa. Dra. ENEIVA CARLA CARVALHO CELEGHINI

Departamento de Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / Pirassununga/SP

Data da realização: 19 de Julho de 2012.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Letícia Zoccolaro Oliveira nasceu na cidade de Piracicaba, em 6 de fevereiro de 1981. Em janeiro de 2000 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF, Niterói, RJ). Em janeiro de 2005, apresentou relatório de estágio supervisionado em Clínica e Reprodução de Grandes Animais, sob orientação do Prof. Ney Queiroz da Silva, para conclusão do curso de graduação. No período de março a novembro de 2005, realizou estágio no exterior no Dept. "Animal Science" da "Michigan State University" (MSU, East Lansing, MI, EUA), sob orientação do Prof. Dr. J. Richard Pursley, onde desenvolveu atividades relacionadas ao controle farmacológico do ciclo reprodutivo, IATF e ultrassonografia reprodutiva de vacas de leite. Em março de 2007 ingressou no curso de Mestrado, do Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração Reprodução Animal, da FCAV – UNESP de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, concluindo-o em janeiro de 2009. Durante o período de outubro de 2009 a julho de 2010 ministrou aulas de Fisiopatologia da Reprodução I e II, como professora substituta do Depto. de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU, Uberlândia, MG). Em março de 2009, ingressou no curso de Doutorado, do Programa de Medicina Veterinária (Reprodução Animal), da FCAV – UNESP de Jaboticabal. Durante o período de maio de 2011 a novembro de 2011, realizou Doutorado Sanduiche (bolsista CAPES de estágio no exterior: 0077-11-9) no Departamento de "Animal Science" da Michigan State University, novamente sob orientação do Prof. Dr. J. Richard Pursley, onde participou de pesquisas com dinâmica e aspiração folicular, dosagem hormonal e protocolos de pré-sincronização em vacas de leite.

“Melhor tentar e falhar, que ver a vida passar.
Melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Prefiro na chuva caminhar a, em dias tristes, em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”

(Martin Luther King)

Dedico

Ao meu pai Danilo Tostes Oliveira,

À minha mãe Inês Aparecida Zoccolaro.

A eles ofereço e dedico essa tese e todas as conquistas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por tudo e por todas as pessoas maravilhosas que fazem ou fizeram parte da minha vida pessoal e profissional. Com certeza me faltarão palavras para expressar o tanto que sou grata:

Ao meus melhores amigos, meu pai Danilo, minha mãe Inês e minha irmã Larissa. Agradeço-lhes por cada dia, pelo que sou e por tudo o que eles são pra mim. Pelos conselhos, por todo amor, carinho, dedicação, força e incentivo.

Aos meus avós Job e Terezinha, e João e Maria, por todos os valores e ensinamentos passados. Por todas as palavras de sabedoria e por serem exemplos de força, família e dignidade.

Aos meus tios Gina, Ricardo, Sônia, Denise, Nilceu, Delma, Décio, Soninha e Daniel, por todo amor, exemplo, carinho e ajuda, em todos os momentos que já precisei e sempre precisarei.

Aos mestres, que além de amigos, sigo como exemplo profissional e pessoal:

À minha orientadora, Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, pela oportunidade, amizade, incentivo e carinho. Pela confiança em mim depositada, permitindo que esse sonho se realizasse.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, pela oportunidade, receptividade, orientação, sabedoria e pela amizade. Por todos os ensinamentos passados. Pela honra de me permitir trabalhar com sua equipe.

À minha querida amiga e co-orientadora, Profa. Dra. Ricarda Maria dos Santos, pelos conselhos, pela confiança, pela orientação, pelos ensinamentos, pela força e pelo carinho. Por toda sua ajuda, amizade e companhia, sempre.

Ao Professor, Dr. James Richard Pursley. Thanks for the friendship and collaboration. Thanks for the honor of allowing me to learn and to work with you and your team.

Ao amigo, Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade, por toda a contribuição e ajuda fundamental para a realização deste trabalho que não teria sido realizado sem sua ajuda. Muito obrigada pelos conselhos, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, por toda ajuda e apoio fundamental com esta e outras pesquisas realizadas. Pelos ensinamentos, pela colaboração e pela cordialidade.

À Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, pelas sugestões e ensinamentos. Pelos conselhos, pelo carinho, pela amizade e gentileza incondicional.

Ao grande amigo, Dr. Fabio Morato Monteiro, parceiro de pesquisas, trabalhos e momentos de descontração. Meu amigo e colaborador!

Ao meu primo, MV. Msc. Marcelo Zoccolaro Costa, por toda amizade, apoio, ensinamento e incentivo incondicional. Por ter sido meu primeiro mestre.

Aos professores da banca de defesa de doutorado, Prof. Dr. Ed Hoffman Madureira, Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo, Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini e Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti. MUITÍSSIMO obrigada pela disponibilidade, pelas sugestões, por toda atenção, e pela honra da presença.

Aos amigos:

Ao amigo de tantos anos, João Paulo Nascimento Martins, pela fundamental ajuda tanto pessoal como profissional. Pelo carinho, amizade, colaboração e companhia. Por ser como um irmão.

À grande amiga e companheira, Clara Slade Oliveira. Um super exemplo.

Aos amigos Milton Maturana-Filho, Daniela Franco e Henrique Carvalho pela fundamental ajuda durante o experimento laboratorial, amizade e companhia.

Ao amigo e colaborador fundamental para a realização deste trabalho, MV. MSc. Rogério Fonseca Guimarães Peres, pelo apoio e pela amizade. Pela colaboração, gentileza e confiança. Por nos permitir realizar este trabalho da melhor forma possível.

À Profa. Dra. Flavia Lopes, pela presença na banca examinadora da qualificação, pela gentileza e pelas sugestões para este trabalho.

Ao Dr. Pablo Daniel Reeb pela ajuda, amizade e colaboração fundamental com a parte estatística deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Julio Carlos Canola e sua família. Por toda ajuda, amizade e gentileza. Por todo o carinho.

Aos Médicos Veterinários José Ricardo Garla Maio, Gabriel Crepaldi e à Ouro Fino Saúde Animal, pela ajuda e colaboração.

Aos Médicos Veterinários Thiago Martins, Hugo Borges Graff, Everton Carvalho, Rogério Fonseca Guimarães Peres, bem como a todos os funcionários e amigos da AFB (Agropecuária Fazenda Brasil), pela fundamental ajuda e colaboração. Porque eu pude contar incondicionalmente com mão-de-obra altamente qualificada para realização deste trabalho.

Aos queridos amigos do Departamento de Reprodução Animal da FCAV/UNESP Jaboticabal, aos queridos amigos do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da USP Pirassununga, e aos queridos amigos da Michigan State University, por toda ajuda e por todos os maravilhosos momentos de alegria. A amizade, o carinho e a companhia de vocês tornaram o aprendizado adquirido durante meu doutorado e doutorado-sanduiche uma maravilhosa jornada.

Agradeço imensamente a Coordenação de Apoio a Pesquisa (CAPES), pelo auxílio sob a forma de bolsa de doutorado dentro do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (FCAV/UNESP Jaboticabal), e sob a forma de bolsa doutorado sanduiche (processo 0077-11-9), que possibilitaram o aprimoramento profissional na formação de doutor em Reprodução Animal.

De fato, sou extremamente grata a todos que, de alguma forma, colaboraram para essa minha conquista. A realização deste sonho me enche de satisfação e alegria. Mas é, na verdade, a amizade e a colaboração das pessoas com quem pude contar que me enchem de orgulho.

Muito obrigada a todos!

APOIO FINANCEIRO

Esse projeto recebeu apoio financeiro:

Da Coordenação de Apoio a Pesquisa (CAPES), sob a forma de bolsa de doutorado dentro do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, e sob a forma de bolsa doutorado sanduiche (processo 0077-11-9; maio/2011 a outubro/2011), que possibilitaram o aprimoramento profissional na formação de doutor em Reprodução Animal.

Da Empresa Ouro Fino Saúde Animal, sob a forma de fornecimento de hormônios reprodutivos para execução do protocolo de IATF do experimento.

Da Agropecuária Fazenda Brasil, sob a forma de fornecimento de sêmen de touros Angus, mão de obra de seus funcionários, e locação para realização do experimento a campo. A empresa nos permitiu a utilização de seus animais e completa infraestrutura para realização do trabalho a campo.

Do Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da USP Pirassununga (VRA), sob a forma de apoio e locação para realização do experimento laboratorial, nos permitindo a utilização dos equipamentos, materiais de consumo e completa infraestrutura para realização do trabalho laboratorial.

SUMÁRIO

	Pág
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
RESUMO.....	xix
SUMMARY.....	xxi
I. CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
1.1. INTRODUÇÃO.....	01
1.2. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
1.2.1. Inseminação Artificial em Bovinos.....	04
1.2.2. Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).....	06
1.2.3. O sêmen utilizado nos programas de IATF.....	09
1.2.4. Correlação das análises laboratoriais com a fertilidade à campo.....	15
1.2.5. Análise laboratorial do sêmen bovino	18
1.2.5.1. Análise convencional do sêmen.....	19
1.2.5.2. Teste Hipo-osmótico (“Hypoosmotic Swelling Test”; HOST).....	21
1.2.5.3. Teste de Termo-resistencia (TTR).....	22
1.2.5.4. Análise computadorizada do movimento espermático.....	23
1.2.5.5. Análises espermáticas por citometria de fluxo.....	25
1.2.5.5.1. Avaliação das membranas plasmática e acrossomal.....	27
1.2.5.5.2. Avaliação da estabilidade da membrana plasmática	29
1.2.5.5.3. Avaliação da peroxidação lipídica da membrana.....	31

1.2.5.6. Análise computadorizada de morfometria espermática e integridade cromatínica	32
1.3.HIPÓTESES.....	37
1.4.OBJETIVOS.....	38
1.5. DESCRIÇÃO PRELIMINAR DOS CAPÍTULOS II, III e IV.....	39
II. CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO: Efeito do descongelamento simultâneo de várias palhetas de sêmen e da sequencia de inseminação na taxa de concepção da Inseminação Artificial em Tempo Fixo em vacas Nelores pós-parto.....	40
III. CAPÍTULO 3 - ARTIGO CIENTÍFICO: Avaliação da fertilidade à campo e de diversas características espermáticas <i>in vitro</i> após o uso de diferentes touros Angus em um programa de IATF de vacas Nelores pós-parto.....	83
IV. CAPÍTULO 4 - ARTIGO CIENTÍFICO: Avaliação da importância de diversas características espermáticas <i>in vitro</i> na predição da fertilidade à campo após um programa de IATF bovino.....	108
V. CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	142
VI. CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO	144
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146
VIII. APÊNDICE.....	170

LISTAS DE ABREVIATURAS

AcI - células apresentando acrossoma intacto

AIMI - espermatozoides apresentando membranas plasmática e acrossomal intactas

AIML - espermatozoides apresentando membrana plasmática lesionada e membrana acrossomal intacta

ALMI - espermatozoides apresentando membrana plasmática intacta e membrana acrossomal lesionada

ALML - espermatozoides apresentando membranas plasmática e acrossomal lesionadas

ALH - Amplitude do deslocamento lateral da cabeça

ALH_2h - Deslocamento lateral da cabeça avaliada após 2 horas de incubação

ANOVA - Análise de variância

BCF - Frequência de batimentos flagelar

BCF_2h - Frequência de batimentos avaliada após 2 horas de incubação

BE - Benzoato de estradiol

C11-BODIPY^{581/591} - Sonda fluorescente 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3 ácido undecanóico

CASA - Análise computadorizada do semên (“Computer-Assisted Semen Analysis”)

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

CL - Corpo Lúteo

CV - Coeficiente de variação da intensidade de tons de cinza de cada cabeça espermática, o qual representa a heterogeneidade cromatínica

Dif% - Porcentagem de espermatozoides com cromatina considerada descompactada na amostra

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ECC - Escore de condição corporal

eCG - Gonadotrofina coriônica equina

ECP - Cipionato de estradiol

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FITC-PSA - Isotiocianato de fluoresceína conjugado com aglutinina de *Pisum Sativum*

FIV - Fecundação *in vitro*

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina

Grupo1-IATF - vacas inseminadas com a primeira, segunda ou terceira palheta retirada do banho-maria (Palheta1-IA, Palheta2-IA e Palheta3-IA);

Grupo2-IATF - vacas inseminadas com a quarta, quinta ou sexta palheta retirada do banho-maria (Palheta4-IA, Palheta5-IA e Palheta6-IA);

Grupo3-IATF - vacas inseminadas com a sétima, oitava, nona ou décima palheta retirada do banho-maria (Palheta7-IA, Palheta8-IA, Palheta9-IA e Palheta10-IA)

H342 - Corante fluorescente Hoechst 33342

HOST - Teste Hiposmótico (Hypoosmotic Swelling Test)

Hz - Hertz

IA - Inseminação Artificial

IATF - Inseminação artificial em tempo fixo

i.m. - intramuscular

LH – Hormônio luteinizante

LIN - Linearidade

LIN_2h - Linearidade avaliada após 2 horas de incubação

µg – micrograma

µm/s – micrômetros por segundo

µM - micromolar

M540 - sonda fluorescente merocianina 540

MIAD - espermatozoide com membrana plasmática íntegra e alto grau de desorganização da bicamada lipídica.

MIBD - espermatozoide com membrana plasmática íntegra e baixo grau de desorganização da bicamada lipídica;

mg – miligrama

MINP - espermatozoides com membrana plasmática íntegra e reduzida peroxidação lipídica

MIP - espermatozoides com membrana plasmática íntegra e elevada peroxidação lipídica

mL - mililitro

mM - milimolar

mOsm - miliosmol

MP_2h - Motilidade progressiva avaliada após 2 horas de incubação

MPI - Células com Membrana Plasmática Intacta

MPL - espermatozoide com membrana plasmática lesionada (Yo-Pro-1 positiva)

MT - Motilidade total

MT_2h - Motilidade total avaliada após 2 horas de incubação

nm - nanômetro

P - nível de significância

P4 - Progesterona

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

pH - potencial hidrogeniônico

PGF2 α - Prostaglandina F2 α

PI - Iodeto de Propídio

PIV - produção *in vitro*

PM - Motilidade progressiva

RAPID - Porcentagem de células rápidas na amostra

RAPID_2h - Células rápidas na amostra avaliada após 2 horas de incubação

SAS - “Statistical Analysis System” (Sistema de Análise estatística)

STR - Retilinearidade

STR_2h - Retilinearidade avaliada após 2 horas de incubação

TALP - “Tyrode’s Albumin Lactate Pyruvate”

TALPm - meio TALP modificado

TTR - Teste de Termo-resistência espermática

UI - Unidade Internacional

UV - Ultravioleta

VAP - Velocidade sobre um trajeto uniforme

VAP_2h - Velocidade uniforme avaliada após 2 horas de incubação

VCL - Velocidade curvilinear

VCL_2h - Velocidade curvilinear avaliada após 2 horas de incubação

VSL - Velocidade retilínea progressiva

VSL_2h - Velocidade retilínea avaliada após 2 horas de incubação

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 (Artigo científico 1).** Média e variação de tempo que cada palheta da sequência de inseminação permaneceu no descongelador, após descongelamento simultâneo de dez palhetas de sêmen até o momento da IA, considerando o tempo mínimo de descongelamento de 30 seg como tempo zero.....**50**
- Tabela 2 (Artigo científico 1).** Taxa de concepção observada 40 dias após inseminação artificial em tempo fixo de vacas Nelore pluríparas lactantes.....**67**
- Tabela 3 (Artigo científico 1).** Dados descritivos da taxa de concepção observada 40 dias após inseminação artificial em tempo fixo de vacas Nelore pluríparas lactantes, separada por partida.....**67**
- Tabela 4 (Artigo científico 1).** Média do intervalo de tempo entre a inserção das dez palhetas de sêmen no descongelador até o momento da IA, para cada Grupo de palheta (Grupo1-IATF, Grupo2-IATF e Grupo3-IATF).....**70**
- Tabela 5 (Artigo científico 1).** Média (\pm desvio padrão) das características espermáticas *in vitro* do sêmen dos grupos Palheta1-Lab e Palheta10-Lab, avaliadas pela análise computadorizada do sêmen (CASA) após 0 e 2 h de incubação térmica a 37°C.....**76**
- Tabela 6 (Artigo científico 1).** Média (\pm desvio padrão) das características espermáticas *in vitro* do sêmen dos grupos Palheta1-Lab e Palheta10-Lab, avaliadas pelas análises de integridade de membranas plasmática e

acrossomal, peroxidação lipídica, morfometria espermática e compactação cromatínica.....	77
Tabela 1 (Artigo científico 2). Taxa de concepção e parâmetros da motilidade <i>in vitro</i> (média ± desvio padrão) após 0 e 2 hs de incubação (à 37°C) obtidas na análise do sêmen dos três touros utilizados no programa de IATF...	100
Tabela 2 (Artigo científico 2). Dados descritivos, por partida, da taxa de concepção dos três touros utilizados no programa de IATF.....	100
Tabela 3 (Artigo científico 2). Média ± desvio padrão das análises do teste hiposmótico (HOST), da integridade das membranas plasmática e acrossomal, da peroxidação lipídica e da morfologia espermática do sêmen dos três touros utilizados no programa de IATF.....	103
Tabela 4 (Artigo científico 2). Média ± desvio padrão das análises da morfometria e estrutura cromatínica do sêmen dos três touros utilizados no programa de IATF.....	105
Tabela 1 (Artigo científico 3). Valores de VIP (importância da variável para projeção) e coeficientes de predição obtidos ao final dos procedimentos PLS com as variáveis das Palhetas 1 e 10, em resposta à predição da taxa de concepção	133

LISTA DE FIGURAS

- Figura1 (Artigo científico 1).** Distribuição do tempo de incubação por palheta, de acordo com os dados das 944 inseminações, referente ao período de permanência das dez palhetas de sêmen após descongelamento simultâneo, considerando o tempo mínimo de 30 segundos como tempo zero.....**51**
- Figura 2 (Artigo científico 1).** Gráficos e histogramas de espermatozoides bovino analisados por citometria de fluxo, para avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal.....**58**
- Figura 3 (Artigo científico 1).** Gráficos e histogramas de espermatozoides bovino analisados por citometria de fluxo para avaliação da peroxidação lipídica...**60**
- Figura 4 (Artigo científico 1).** Taxa de concepção após IATF de vacas Nelore pós-parto, inseminadas com a primeira (Palheta1-IA) até a décima (Palheta10-IA) palheta da sequência de inseminação, após descongelamento simultâneo de dez palhetas de sêmen.....**66**
- Figura 5 (Artigo científico 1).** Variação da temperatura do banho-maria termostaticamente controlado (400 mL) durante o descongelamento simultâneo de dez palhetas de 0.5 mL de sêmen.....**73**
- Figura 1 (Artigo científico 3).** Delineamento do experimento laboratorial.....**115**
- Figura 2 (Artigo científico 3).** Gráfico de importância das variáveis do primeiro procedimento PLS com resultados da palheta 1.....**125**
- Figura 3 (Artigo científico 3).** Gráfico de importância das variáveis do segundo procedimento PLS com resultados da palheta 1.....**126**

Figura 4 (Artigo científico 3). Gráfico de importância das variáveis do terceiro procedimento PLS com resultados da palheta 1.....	127
Figura 5 (Artigo científico 3). Gráfico de importância das variáveis do primeiro procedimento PLS com resultados da palheta 10.....	129
Figura 6 (Artigo científico 3). Gráfico de importância das variáveis do segundo procedimento PLS com resultados da palheta 10.....	130
Figura 7 (Artigo científico 3). Gráfico de importância das variáveis do terceiro procedimento PLS com resultados da palheta 10.....	131

UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES TOUROS NA IATF: CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E SUAS RELAÇÕES COM AS TAXAS DE FERTILIDADE A CAMPO

RESUMO – Tem sido frequentemente demonstrado que variadas taxas de concepção podem ser obtidas de acordo com o sêmen utilizado, evidenciando uma importante variabilidade individual do reprodutor com relação à fertilidade. Além disso, as grandes dimensões dos rebanhos, associado ao intenso e crescente uso dos protocolos de IATF no Brasil, tem estimulado, cada vez mais, a prática do descongelamento simultâneo de diversas palhetas de sêmen em um mesmo descongelador. Entretanto, sob essas condições, o banho-maria do descongelador poderia atuar como ambiente de incubação para o sêmen, o que poderia influenciar a viabilidade do espermatozoide. Assim, o presente estudo teve por objetivos: 1) determinar o efeito da sequência de inseminação, após descongelamento simultâneo de diversas palhetas de sêmen, na taxa de concepção e na qualidade seminal; 2) investigar a fertilidade *in vivo*, bem como diversas características espermáticas *in vitro*, do sêmen de diferentes reprodutores utilizados no mesmo programa de IATF; 3) identificar, dentre as diversas análises laboratoriais realizadas, o grupo de características espermáticas consideradas importantes na predição da taxa de concepção. Para tal, o presente experimento foi realizado em duas etapas. A primeira etapa consistiu em um estudo a campo delineado para determinar a taxa de concepção após IATF de fêmeas pós-parto da raça Nelore (n=947), utilizando sêmen de três partidas de cada um dos três touros da raça Angus (n=9). A segunda etapa consistiu em um estudo laboratorial delineado para investigar diversas características espermáticas das doses de sêmen utilizadas no respectivo programa de IATF,

utilizando as mesmas condições de descongelamento do estudo a campo. As seguintes análises laboratoriais foram realizadas: análise computadorizada do movimento espermático, teste hipo-osmótico, termo-resistência espermática após 2 h de incubação, concentração, morfologia espermática, integridade de membranas plasmática e acrossomal, estabilidade da membrana plasmática, peroxidação lipídica, morfometria espermática e condensação cromatínica. De acordo com o presente experimento, concluiu-se que a seqüência de inseminação após descongelamento simultâneo de múltiplas palhetas de sêmen pode influenciar a taxa de concepção, dependendo do touro que é utilizado. Adicionalmente, embora não tenha sido observado efeito de touro no experimento a campo, o reprodutor que apresentou taxa de concepção numericamente inferior, também apresentou pior qualidade seminal de acordo com as análises laboratoriais realizadas. Concluiu-se ainda que o método estatístico dos mínimos quadrados parciais (*“Partial Least Squares”*; PLS) possibilitou selecionar um grupo de variáveis espermáticas avaliadas *in vitro*, consideradas mais importantes na predição da fertilidade *in vivo* dos touros avaliados.

Palavras-chave: características espermáticas, fertilidade do touro, IATF, seqüência de inseminação, taxa de concepção.

THE USE OF DIFFERENT BULLS IN TIMED-AI PROGRAM: SEMINAL CHARACTERISTICS AND THEIR RELATIONSHIP WITH FIELD FERTILITY

SUMMARY – It has been reported that different conception rates can be obtained according to the semen used, indicating a significant variability regarding sire fertility. Furthermore, the large size of reproductive herds associated with the intense use of Timed-AI protocols in Brazil, has stimulated the routine practice of simultaneous thawing of multiple semen straws in the same thawing-bath. However, under these conditions, the thawing-bath could act as an incubator environment for the semen, which could influence the sperm viability. Thus, this study aimed to: 1) determine the effect of sequence of insemination after simultaneous thawing of multiple semen straws on conception rate and semen quality; 2) investigate the *in vivo* fertility, as well as several *in vitro* sperm characteristics, from different sires used in the same Timed-AI program; 3) identify, among the several *in vitro* sperm variables evaluated in laboratory, the group of sperm characteristics considered important in the prediction of conception rate. Hence, this study was conducted in two experiments. The first experiment was a field study designed to determine conception rate after Timed-AI of suckled multiparous Nelore cows (n = 944) using three semen batches from three Angus bulls (n = 9). The second experiment was a laboratory study designed to investigate several sperm characteristics of semen used in the Timed-AI program, using the same thawing conditions applied in the field experiment. The following laboratory analyses were performed: computer assisted semen analysis, hypo-osmotic swelling test, sperm resistance after 2 hours of thermal

incubation, sperm morphology, integrity of plasma and acrosomal membranes, plasma membrane stability, lipid peroxidation, sperm morphology and chromatin condensation. According to the present experiment, it was concluded that sequence of insemination after simultaneous thawing of multiple semen straws can affect conception rate depending on which bull is used at Timed-AI program. Additionally, although no bull effect was observed in the field experiment, the sire presenting numerically lower conception rate also presented inferior semen quality according to the laboratory analyzes performed. Finally, it was also concluded that the statistical method of partial least squares (PLS) is a statistical method that was capable of selecting a group of *in vitro* sperm variables considered important in the prediction of *in vivo* bull fertility.

Keywords: bull fertility, conception rate, sequence of insemination, sperm characteristics, Timed-AI.

I. CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a pecuária vem passando por um processo de incorporação de tecnologia visando principalmente melhoria dos índices de produtividade e a aceleração do melhoramento genético. Neste sentido, considera-se a inseminação artificial (IA) como a biotécnica mais importante incorporada aos sistemas de produção da pecuária (SUGULLE et al., 2006), pois implica em aproveitamento e globalização de touros zootecnicamente superiores, representando uma biotécnica fundamental para a obtenção de animais de maior mérito genético.

Em virtude das dificuldades encontradas para a implementação da IA na maioria dos sistemas de produção, e, a partir de estudos dedicados ao maior entendimento da fisiologia reprodutiva da fêmea bovina, diversos protocolos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e a ovulação têm sido desenvolvidos e empregados comercialmente (PURSLEY et al., 1995; BÓ et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004; MENEGHETTI et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2011), tornando possível a prática da inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Assim, além de representar uma importante ferramenta de manejo dos rebanhos bovinos por excluir a necessidade da observação de estro, a IATF diminui o impacto do anestro pós-parto e aumenta a taxa de serviço das propriedades, contribuindo efetivamente para maior ganho econômico e genético.

Entretanto, embora os fatores relativos à fêmea bovina que influenciam no sucesso dos programas de IATF têm sido intensamente estudados, os fatores relacionados com a qualidade do sêmen utilizado nos programas de IA não têm recebido a mesma atenção. Neste sentido, tem sido relatado que touros diferem em sua habilidade de fertilizar ovócitos e/ou se desenvolver ao estágio de blastocisto após fertilização *in vitro* (FIV). Da mesma forma, diversos trabalhos têm demonstrado variadas taxas de concepção de acordo com o sêmen utilizado, evidenciando uma importante variabilidade individual do reprodutor com relação à fertilidade a campo, o também chamado “efeito touro” (SHAMSUDDIN & LARSSON, 1993; CORREA et al., 1997; ANDERSSON et al. 2004; SÁ FILHO et al., 2009; SUDANO et al., 2011).

Ainda em relação à qualidade do sêmen empregado nos programas de IA, ressalta-se a atual prática rotineira do descongelamento simultâneo de diversas palhetas de sêmen.

O vasto tamanho dos rebanhos reprodutivos, associado ao intenso e crescente uso dos protocolos de IATF no Brasil, torna imprescindível que um grande número de vacas seja inseminado em um curto período de tempo. Portanto, todo o procedimento envolvendo o momento da inseminação precisa ser cada vez mais rápido e eficiente, o que têm estimulado cada vez mais a aplicação desse método de descongelamento seminal. Entretanto, é importante destacar que, sob essas condições, algumas palhetas permanecem no banho-maria enquanto a inseminação com outras palhetas ocorre. Neste caso, o banho-maria poderia atuar como ambiente de incubação para o sêmen, o que por sua vez, poderia influenciar a viabilidade e a fertilidade do espermatozoide.

A constatação de que diversos fatores inerentes à qualidade seminal influenciam significativamente os resultados de campo aponta, cada vez mais, para a necessidade de estudos dedicados a uma detalhada análise da qualidade do sêmen. Neste sentido, desde as últimas décadas, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de se desenvolver um teste laboratorial que fosse capaz de avaliar o sêmen de diferentes touros e prever seu desempenho reprodutivo na IA. Este tipo de teste seria muito benéfico para a indústria de sêmen, visto que reduziria a probabilidade de utilizar touros de baixa fertilidade nos programas reprodutivos (TARTAGLIONE & RITTA, 2004) e excluiria a necessidade de inseminar grande número de fêmeas para a realização dos onerosos testes de fertilidade a campo (SUDANO et al., 2011).

Porém, considerando a complexidade dos eventos envolvidos no processo de fertilização, é improvável que uma única característica espermática possa refletir a real capacidade fertilizante da amostra seminal. Portanto, julga-se razoável considerar que a predição do potencial de fertilidade de um touro é mais acurada quando uma combinação de diversas análises espermáticas é realizada (ARRUDA et al., 2007; ARRUDA et al., 2011).

Diante do exposto, alerta-se para a atual necessidade de estudos relacionados com a qualidade do sêmen utilizado nos programas de IATF, que sejam realizados com o intuito de explorar as características seminais de diferentes touros e sua influência nas taxas de concepção.

1.2. REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1. Inseminação Artificial em Bovinos

Em animais de interesse zootécnico, o principal objetivo da utilização das biotécnicas de reprodução é aumentar a eficiência produtiva e/ou reprodutiva do rebanho. A IA foi a primeira importante ferramenta reprodutiva aplicada em benefício do melhoramento genético de animais de produção (FOOTE, 2002). Em bovinos, sua utilização em larga escala se concretizou com a viabilização da criopreservação espermática após a descoberta de substâncias com propriedades crioprotetoras (GAO et al., 1997).

Atualmente, a IA figura como a biotécnica da reprodução mais utilizada em todo o mundo (PARKINSON, 2004) e corresponde a um método fundamental para a obtenção de animais com maior potencial genético (SUGULLE et al., 2006) e interessante relação custo/benefício (VASCONCELOS & SÁ FILHO, 2010). Apesar do marcante papel desta biotécnica no incremento da produtividade, somente uma pequena parcela das fêmeas são incluídas nos programas de IA. No Brasil, estima-se que aproximadamente apenas 10% das fêmeas em idade reprodutiva são inseminadas (ASBIA, 2011).

Dentre os fatores que podem ser apontados como as principais causas para o baixo percentual da utilização da IA no manejo reprodutivo de bovinos, podem ser destacados a carência de mão de obra qualificada e algumas deficiências básicas na infra-estrutura das propriedades (BARROS & ERENO, 2004). Ainda, os principais empecilhos para a implementação dos programas de IA em países de

clima tropical estão relacionados com a baixa taxa de detecção do estro, situação comum em rebanhos compostos predominantemente por animais *Bos indicus*, que podem não demonstrar sinais evidentes de estro (GALINA et al., 1996). Esta ocorrência se agrava com o alto índice de fêmeas em balanço energético negativo e/ou baixo escore de condição corporal (ECC), sobretudo no período pós-parto, quando mantidos em sistema com insuficiente disponibilidade de matéria seca (MADUREIRA & PIMENTEL, 2005; CRESPILO, 2010). Ainda, vale ressaltar que as grandes dimensões das propriedades de criação extensiva do Brasil, em especial as que apresentam deficiências básicas de manejo, dificultam a aplicação dos programas de IA. Isso porque, nestas condições, a procura e a observação do gado se tornam tarefas mais laboriosas e menos eficientes.

Assim, a adoção da biotécnica da IATF, que por meio da utilização de hormônios induz a sincronização do estro e da ovulação, auxilia efetivamente a aplicabilidade da IA permitindo sua massificação. O emprego desta ferramenta de manejo suprime a necessidade de observação de estro e permite que um grande número de animais seja inseminado no mesmo dia (PURSLEY et al., 1995; THATCHER et al., 1996; BÓ et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004). Atualmente, a IATF tem sido mundialmente utilizada como uma importantíssima ferramenta de manejo reprodutivo em sistemas de produção de gado de corte e de leite (PURSLEY et al., 1995; THATCHER et al., 1996; PURSLEY et al., 1998; BÓ et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004; MADUREIRA & PIMENTEL, 2005; CHEBEL et al., 2006; GALVÃO et al., 2007; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ-FILHO et al., 2009; BISINOTO et al., 2010; SÁ-FILHO et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2011).

1.2.2. Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)

Em virtude das dificuldades encontradas para a implementação da IA na grande maioria dos sistemas de produção, e, a partir de estudos dedicados ao maior entendimento da fisiologia reprodutiva da fêmea bovina, diversos protocolos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e a ovulação têm sido desenvolvidos e empregados comercialmente, tornando possível a prática da IATF (PURSLEY et al., 1995; BÓ et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004; PURSLEY et al., 1995; PURSLEY et al., 1998; CHEBEL et al., 2006; GALVÃO et al., 2007; MENEGHETTI et al., 2009; BISINOTO et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2011).

Assim, a possibilidade da realização da inseminação em tempo pré-determinado, e sem a necessidade de observação de estro, fez com que os programas de IATF representassem a forma mais prática para o aumento da utilização da IA na pecuária atual (SÁ FILHO et al., 2010). Além de representar uma importante ferramenta de gestão dos rebanhos bovinos por aumentar a taxa de serviço das propriedades, a IATF também pode diminuir o impacto negativo do anestro pós-parto por induzir a ovulação e/ou a ciclicidade dos animais em anestro. Esses fatores são determinantes para maior ganho econômico e genético (MADUREIRA & PIMENTEL, 2005; CRESPILO, 2010).

Nos países da América do Norte, principalmente em vacas leiteiras de alta produção, predomina-se a utilização dos protocolos de IATF que utilizam a combinação entre GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) e PGF (Prostaglandina F_{2α}), o chamado protocolo Ovsynch (PURSLEY *et al.*, 1995) e suas modificações. De maneira geral, o GnRH administrado no primeiro dia do

programa (dia 0) induz a ovulação do folículo dominante e o início de uma nova onda folicular. A PGF administrada sete dias após (dia 7) tem a finalidade de causar luteólise e a consequente queda nos níveis plasmáticos de progesterona (P4). Por sua vez, a subsequente dose de GnRH aplicada no dia 9 do protocolo tem o objetivo de induzir o pico de LH (hormônio luteinizante) e, portanto, sincronizar a ovulação das fêmeas bovinas. Nestes protocolos, a IATF geralmente é realizada 12-24 horas após esta segunda aplicação de GnRH (PURSLEY et al., 1995; THATCHER et al., 1996; PURSLEY et al., 1998; CHEBEL et al., 2006; BISINOTO et al., 2010).

Já na América do Sul, devido principalmente à predominância de gado *Bos Indicus*, o uso de protocolos a base de estrógenos e progestágenos (ou P4) correspondem ao tratamento mais utilizado para a IATF de bovinos (BÓ et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004; MADUREIRA & PIMENTEL, 2005; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010). A administração de benzoato de estradiol (BE) associado à inserção de dispositivos liberadores de P4 no primeiro dia do programa (dia 0) resulta em sincronização da emergência de uma nova onda de crescimento folicular. Outro aspecto comum entre esses protocolos é a administração de PGF geralmente no dia da retirada do dispositivo (por volta do dia 8), que tem por finalidade causar a lise do corpo lúteo (CL) possivelmente existente. Ainda, associado à administração da PGF, é comum realizar-se a aplicação de cipionato de estradiol (ECP) e gonadotrofina coriônica equina (eCG). O ECP tem a finalidade de sincronizar, sob baixas concentrações de progesterona plasmática, a indução do pico de GnRH, que por sua vez induz o pico de LH e sincroniza a ovulação dos animais. A eCG, incorporada aos protocolos de

sincronização, tem a finalidade de aumentar a taxa de ovulação e o diâmetro do folículo pré-ovulatório em animais *Bos indicus* em anestro e/ou com baixo ECC (BÓ et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004; MADUREIRA & PIMENTEL, 2005; SÁ FILHO et al., 2010). Na maioria dos protocolos dessa natureza, a IATF ocorre 48 a 60 horas após a remoção do dispositivo liberador de P4 (SÁ FILHO et al., 2010).

Embora sejam notórios os evidentes avanços nos sistemas de produção de gado de corte e leite a partir do desenvolvimento comercial da IATF, os diversos trabalhos envolvendo a utilização de diferentes protocolos apontam índices médios de concepção ao redor de 45 a 65% para gado de corte (BÓ et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004; MADUREIRA & PIMENTEL, 2005; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ-FILHO et al., 2009; SÁ-FILHO et al., 2010), e ao redor de 20 a 40% para gado de leite (PURSLEY et al., 1995; PURSLEY et al., 1998; CHEBEL et al., 2006; GALVÃO et al., 2007; BISINOTO et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2011). Apesar de aceitáveis, estes resultados ainda encontram-se distantes do desempenho reprodutivo ideal, tornando onerosa a biotécnica da IATF para alguns sistemas de produção (CRESPILHO, 2010).

Inúmeras causas podem ser apontadas para a amplitude de resultados e/ou a ocorrência de índices insatisfatórios dos programas. Neste sentido, destacam-se os fatores inerentes à fêmea bovina como baixo ECC no início do tratamento, raça do animal, categoria (vacas ou novilhas, primíparas ou pluríparas, lactantes ou solteiras) e tamanho do folículo dominante no momento da indução da ovulação (BÓ et al., 2003; BÓ et al., 2007; BARUSELLI et al., 2004; PERRY et al., 2007; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010). Entretanto, embora os fatores relativos à fêmea que influenciam o sucesso da

IATF têm sido abrangentemente estudados, os fatores relacionados com a qualidade do sêmen utilizado não têm recebido a mesma atenção. Assim, julga-se necessário ressaltar que a qualidade das amostras seminais pode influenciar efetivamente o sucesso destes programas reprodutivos (CRESPILHO, 2010).

1.2.3. O sêmen utilizado nos programas de IATF

Na pecuária, o sucesso dos programas de IA depende, em grande parte, do uso de touros de boa fertilidade. Quando apenas animais com bom histórico de fertilidade são utilizados na IATF, maiores taxas de concepção podem ser alcançadas, aumentando a relação custo/benefício desta biotécnica (SUDANO et al., 2011).

Neste sentido, diversos trabalhos demonstraram uma marcante variabilidade individual entre touros com relação à fertilidade *in vitro* (HILLERY et al., 1990; MARQUANT-LE GUIENNE et al., 1990; SHI et al., 1990; ZHANG et al., 1997; WEI & FUKUI, 1999; SUDANO et al., 2011) e *in vivo*, o também chamado “efeito touro” (CORREA et al., 1997; WARD et al. 2001, ANDERSSON et al. 2004; SÁ FILHO et al., 2009).

SUDANO et al. (2011) demonstraram que o uso de diferentes touros influenciou nos resultados da Produção *in vitro* (PIV) de embriões. Da mesma forma, trabalhos anteriores reportaram que o uso de células espermáticas de diferentes touros diferiram em sua resposta aos métodos de capacitação *in vitro* (MARQUANT-LE GUIENNE et al., 1990) e à manutenção de integridade acrossomal (BROWN et al., 1991). Ainda, variadas taxas de clivagem e formação de

blastocistos foram obtidas de acordo com o touro utilizado (HILLERY et al., 1990; SHI et al., 1990; MARQUANT-LE GUIENNE et al., 1990; SHAMSUDDIN & LARSSON, 1993; ZHANG et al., 1997; WEI & FUKUI, 1999; SUDANO et al., 2011).

Os trabalhos realizados a campo parecem confirmar a influência do “efeito touro”. WARD et al. (2001) demonstraram que a cinética do desenvolvimento embrionário inicial pode variar entre reprodutores. De acordo com os autores, essa diferença pode ser usada para determinar touros de alta e baixa fertilidade a campo. ANDERSSON et al. (2004), reportaram que a interação touro vs. inseminador influencia os resultados dos programas de IA. Evidenciaram também que a dose inseminante apresenta efeitos significativos na fertilidade, dependendo do macho utilizado. No referido trabalho, variação marcante entre touros foi observada principalmente após IA com palhetas contendo 2 milhões de espermatozoides por dose. Similarmente, SÁ FILHO et al. (2009) observaram grande variação na taxa de gestação de acordo com o touro utilizado, caracterizando-se que, assim como o inseminador, o touro foi considerado um fator crítico para o sucesso dos programas de IATF.

Ainda em relação à qualidade do sêmen empregado nos programas reprodutivos, julga-se necessário alertar para a atual prática rotineira do descongelamento simultâneo de diversas palhetas de sêmen no momento da IA. Isso porque, o manejo do sêmen congelado (e/ou de seu ambiente de descongelação) também deve ser considerado como possível fator de influência na qualidade das amostras seminais (DEJARNETTE et al., 2002; 2004) e, portanto, nos resultados da IATF.

A Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA) e o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) recomendam, para IA de bovinos, o procedimento de descongelamento de uma única palheta de sêmen em banho-maria, com temperatura entre 35 a 37°C, durante 30 segundos (para palhetas de 0,5 mL).

Entretanto, devido ao vasto tamanho dos rebanhos em reprodução no Brasil, associado ao crescente uso da IATF em larga escala, frequentemente, diversas vacas precisam ser inseminadas no mesmo momento. Por essa razão, inseminadores precisam ser cada vez mais eficientes para que um grande número de animais seja inseminado em curto intervalo de tempo. Esses fatores têm resultado na prática rotineira do descongelamento simultâneo de várias palhetas de sêmen na mesma unidade de descongelamento, a fim de facilitar o manejo do sêmen e todo o procedimento envolvendo a descongelação seminal.

Todavia, sob estas condições, algumas palhetas permanecem no banho-maria enquanto as outras inseminações são realizadas. Neste caso, o ambiente aquecido do banho-maria poderia servir como um ambiente de incubação para o sêmen, o que poderia influenciar a viabilidade e, portanto, a fertilidade do espermatozoide (BROWN et al., 1991).

Alguns trabalhos em que se realizou descongelamento simultâneo de palhetas seminais foram encontrados na literatura. BROWN et al. (1991) demonstraram, em experimento exclusivamente laboratorial, que até dez palhetas de 0,5 mL podem ser descongeladas ao mesmo tempo em ambiente termostaticamente controlado (36°C), sem comprometer a qualidade seminal *in vitro*. Os autores observaram que, quando as palhetas são agitadas

imediatamente após submersão (para evitar contacto direto entre elas), o descongelamento simultâneo não teve efeito sobre a percentagem de espermatozoides móveis e de integridade acrosomal (BROWN et al., 1991). Entretanto, os autores observaram redução na motilidade e integridade acrossomal quando mais de 10 palhetas descongeladas simultaneamente foram submetidas à incubação de 36°C durante 4 horas.

Em seus estudos, DEJARNETTE et al. (2002; 2004) recomendaram descongelar simultaneamente apenas a quantidade de palhetas de sêmen que pudessem ser depositadas no trato reprodutivo da fêmea dentro de 10 a 15 minutos, mantendo-se sempre a homeostase termal das palhetas durante este intervalo. No entanto, mesmo respeitando estas recomendações, os resultados de diferentes estudos parecem ser contraditórios com relação ao efeito do descongelamento simultâneo das doses seminais nas taxas de concepção após IA (LEE et al., 1997; GOODELL, 2000; SPRENGER et al., 2001; KAPROTH et al., 2002; DALTON et al., 2004).

LEE et al. (1997) demonstraram que a sequência da inseminação pode influenciar as taxas de concepção quando até 4 palhetas foram descongeladas ao mesmo tempo. Embora todas as inseminações (n = 89) ocorreram dentro do tempo recomendado (até 6 minutos), os aplicadores foram expostos à radiação solar durante o transporte da palheta descongelada até o animal. Saliendo-se que o experimento foi conduzido em período de alta temperatura ambiente em região de clima tropical (Hawaií), os dados sugeriram que o insulto térmico pode ter refletido na diminuição linear da taxa de concepção da primeira (48%) para a quarta palheta (25%) utilizada na sequência.

Em estudo subsequente, GOODELL (2000) observaram decréscimo significativo na fertilidade em função da sequência de inseminação, mesmo seguindo os procedimentos de manuseio seminal recomendados. Em seu experimento realizado durante período de temperatura ambiental moderada (no estado do Colorado, EUA), 180 vacas submetidas ao protocolo Ovsynch foram inseminadas por um único inseminador. As taxas de concepção obtidas com a terceira (17%) e quarta (14%) inseminação foram significativamente menores do que a obtida com a primeira (48%) ou segunda (41%) palheta da sequência. O autor concluiu que o descongelamento simultâneo com mais de duas palhetas de sêmen pode reduzir a taxa de concepção.

SPRENGER et al. (2001) demonstraram uma tendência para interação entre rebanho e sequência de inseminação após analisar inúmeras IAs com palhetas de números 2 a 11 na sequência ($n = 6122$). A fim de se aumentar o tamanho da amostra para as análises estatísticas, as palhetas na sequência de inseminação ≥ 7 foram combinadas em um único grupo. Desta forma, dados de 28 rebanhos foram analisados. Entretanto, embora tenha sido observado efeito da sequência de inseminação em um rebanho específico, o efeito sobre a taxa de concepção não foi claramente em função das últimas palhetas da sequência. Neste estudo, o limite de tempo recomendado para realização das IAs foi obedecido (até 15 minutos), exceto quando sete ou mais palhetas foram descongeladas de uma só vez. Quando os dados contendo apenas palhetas 1 a 4 foram analisados, não foi observado efeito da sequência de inseminação sobre as taxas de concepção (SPRENGER et al., 2001).

KAPROTH et al. (2002) e DALTON et al. (2004) também não observaram diferenças nas taxas de concepção em função da sequência de inseminação após descongelamento simultâneo de até quatro palhetas de sêmen. KAPROTH et al. (2002) compararam os efeitos da sequência de inseminação após 2.629 IAs realizadas por um único inseminador. As quatro palhetas foram descongeladas simultaneamente e depositadas nas vacas dentro de 20 minutos. As taxas de concepção nas palhetas 1 a 4 não diferiram estatisticamente (36%, 41%, 37% e 39%, respectivamente). Similarmente, DALTON et al. (2004) compararam as taxas de concepção entre IAs realizadas por inseminadores profissionais e por inseminadores práticos após descongelamento simultâneo de quatro palhetas (n = 1.025). O tempo médio para inseminação das quatro palhetas foi menor que 11 minutos. Embora inseminadores profissionais tenham obtido maiores taxas de concepção (45%) que inseminadores práticos (27%), não foram observados efeitos de sequência de inseminação, nem interação entre inseminador e sequência de inseminação, sobre a taxa de concepção.

Assim, dados de vários estudos revisados por DEJARNETTE et al. (2002) sugerem que o descongelamento simultâneo e a sequência de inseminação exercem pouca influência sobre a taxa de concepção, desde que os inseminadores respeitem os procedimentos recomendados para manipulação do sêmen e possuam adequada proficiência e dedicação para realização da IA (DEJARNETTE et al., 2002; DEJARNETTE et al., 2004).

Diante do exposto, observa-se que embora muitos fatores inerentes à qualidade seminal possam vir a influenciar os resultados da IA (e/ou IATF), poucos estudos com o intuito de especificamente explorar a qualidade do sêmen utilizado

nos programas têm sido realizados. Logo, considera-se pertinente a abordagem de trabalhos relativos à correlação entre as características seminais analisadas laboratorialmente e a fertilidade a campo.

1.2.4. Correlação das análises laboratoriais do sêmen com a fertilidade a campo

Atualmente, muitos métodos clássicos e modernos têm sido utilizados para analisar a qualidade do sêmen pós-criopreservação com o principal objetivo de prever a capacidade fecundante da amostra seminal (REVELL & MRODE, 1994; CORREA et al., 1997; OSTERMEIER et al., 2001a; VERSTEGEN et al., 2002; BROUWERS & GADELLA, 2003; JANUSKAUSKAS et al., 2003; TARTAGLIONE & RITTA, 2004; BELETTI et al., 2005; AITKEN et al. 2007; CELEGHINI et al., 2007; KASIMANICKAM et al., 2007). Entre as características espermáticas mais analisadas laboratorialmente, destacam-se motilidade progressiva (KJAEESTAD et al., 1993; FARREL et al., 1998; VERSTEGEN et al., 2002), morfologia (BARTH, 1992; SAACKE, 1998) e integridade de membranas (CORREA et al., 1997; BRITO et al., 2003; JANUSKAUSKAS et al., 2003; TARTAGLIONE & RITTA, 2004).

Entretanto, embora essas características sejam importantes na análise da qualidade seminal *in vitro*, os resultados desses testes nem sempre se correlacionam com a fertilidade *in vivo* do sêmen.

Neste sentido, avaliações de correlação entre a qualidade seminal *in vitro* e a fertilidade *in vivo* do reprodutor têm sido o tema de muitos estudos (AMANN, 1989; FARRELL et al., 1998; ZHANG et al., 1999; LARSSON & RODRIGUEZ-

MARTINEZ, 2000; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; SUDANO et al. 2011). Todavia, variações substanciais são comumente observadas entre os experimentos e baixas correlações são usualmente detectadas quando essas características espermáticas são comparadas isoladamente com a fertilidade a campo (ZHANG et al., 1999; SUDANO et al., 2011). Assim sendo, até o atual momento, nenhum teste laboratorial foi capaz de prever, com devida repetibilidade, a real fertilidade de um reprodutor (ARRUDA et al., 2007; SUDANO et al., 2011). Deste modo, ainda hoje, o método mais eficaz e acurado de se estimar a fertilidade de um touro é por meio de testes de fertilidade a campo (ZHANG et al., 1999), que além de trabalhosos e demorados, são muito onerosos (LARSSON & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000).

A utilização de técnicas de cultivo embrionário, que permite explorar a fertilidade *in vitro* do reprodutor, tem gerado resultados interessantes, porém, contraditórios. Embora correlações positivas entre a PIV e a fertilidade *in vivo* terem sido relatadas por diversos autores (MARQUANT-LE GUIENNE et al., 1990; SHAMSUDDIN & LARSSON, 1993; LONERGAN, 1994; ZHANG et al. 1997; LARSSON & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000; WARD et al., 2001), outros estudos não confirmaram a ocorrência de alta correlação entre os resultados de fertilidade *in vitro* e *in vivo* dos reprodutores testados (SCHNEIDER et al., 1999; PAPADOPOULOS et al., 2005; VANDAELE et al., 2006). Contudo, recentemente, SUDANO et al. (2011) demonstraram que é possível estimar a fertilidade do touro baseando-se nos resultados da FIV, utilizando modelos de interferência estatística Bayesiana.

Apesar de interessante, parece ainda precipitado garantir que a capacidade individual de fertilização *in vitro* do reprodutor seja realmente um preciso preditor da fertilidade *in vivo* pós-IA. Assim, de acordo com WARD et al. (2001), as variações de protocolos entre diferentes laboratórios de PIV, a baixa repetibilidade dos ensaios e os diversos fatores que podem interferir nos resultados, torna ainda mais incerto garantir que a habilidade de um touro em fertilizar oócitos *in vitro* é um fidedigno prognóstico da fertilidade *in vivo* após IA. Adicionalmente, é importante salientar que a utilização de técnicas mais práticas e menos laboriosas para investigação da qualidade seminal seriam mais vantajosas para a indústria de sêmen do que a necessidade da aplicação dos procedimentos de PIV.

Assim sendo, fica evidente que a identificação de um método prático de análise seminal que fosse capaz de determinar a fertilidade do touro seria de grande benefício para a indústria da IA, pois substituiria por completo a necessidade de experimentos a campo (WARD et al., 2001). Contudo, parece improvável que a avaliação de uma única característica espermática possa refletir a real capacidade fecundante de uma amostra seminal (ARRUDA et al., 2007).

Neste sentido, FARRELL et al. (1998) demonstraram que combinações de múltiplas variáveis obtidas na análise computadorizada do movimento espermático ("*Computer Assisted Sêmen Analysis*"; CASA) apresentaram maiores índices de correlação com a fertilidade a campo do que a avaliação de uma única variável avaliada pelo CASA. Da mesma forma, TARTAGLIONE & RITTA (2004) demonstraram que a combinação de testes de integridade e de funcionalidade da membrana espermática apresentou alto coeficiente de correlação ($r^2 = 78,2$) com a fertilidade *in vitro* de touros. Ainda, quando os resultados do teste de integridade

de membranas plasmática e acrossomal foram incluídos nos modelos de regressão estatística, maior coeficiente de correlação foi obtido ($r^2 = 82,4$). Os autores enfatizaram que maior é a capacidade de prever a fertilidade do sêmen quando maior número de avaliações espermáticas é realizado (TARTAGLIONE & RITTA, 2004).

Logo, selecionar um grupo de características espermáticas que pudessem prever com maior acurácia a taxa de concepção seria uma ferramenta útil e importante para o monitoramento e/ou predição da fertilidade do touro.

1.2.5. Análise laboratorial do sêmen bovino

Como anteriormente descrito, nenhum teste laboratorial isolado pode, até o atual momento, prever com exatidão a fertilidade do sêmen (ARRUDA et al., 2007). Por esta razão, é necessário associar testes de avaliações espermáticas, com o objetivo de melhorar a acurácia de predição do real potencial de fertilização da amostra seminal (AMANN et al., 1989; JANUSKAUSKAS et al., 2003; BRITO et al., 2003; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; TARTAGLIONE & RITTA, 2004; ARRUDA et al., 2007).

Os parâmetros classicamente utilizados na rotina de análise laboratorial do sêmen congelado parecem apresentar valor limitado para o estudo da qualidade seminal sobre as taxas de fertilidade a campo. Assim, acredita-se que a utilização de técnicas mais modernas e precisas permita uma melhor e mais detalhada avaliação do sêmen bovino (ARRUDA et al., 2007).

Neste sentido, critérios mais sensíveis de avaliação da motilidade, morfologia, integridade e função espermática têm sido desenvolvidos e propostos como avaliações complementares no monitoramento da qualidade do sêmen. Assim, surgiu uma variedade de técnicas computadorizadas e corantes fluorescentes (sondas fluorescentes) que forneceram novas ferramentas de acesso à qualidade dos espermatozoides e aumentaram a possibilidade de análise mais criteriosa da mesma (ARRUDA et al., 2011).

1.2.5.1. Análise convencional do sêmen

O método clássico de acessar a viabilidade dos espermatozoides é determinado pela estimativa da porcentagem de células com motilidade progressiva utilizando a microscopia óptica. No entanto, apesar de ser uma forma prática e simples de avaliar indiretamente a atividade metabólica, este método mostra grande subjetividade e variabilidade nos resultados (GARNER et al., 1997).

As análises padrão da avaliação seminal como indicadores da fertilidade do macho incluem ainda o vigor espermático, determinado visualmente de acordo com a intensidade em que os espermatozoides se movimentam, a concentração espermática, estimada com auxílio da câmara de Neubauer, e a avaliação morfológica, na qual o percentual de defeitos classificados como maiores ou menores são avaliados microscopicamente (CBRA, 1998).

Para seleção de touros para monta natural, o sêmen recém-coletado apresenta padrões seminais desejáveis quando a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva é superior a 70%, o vigor é superior

a 3 (na escala de 0 - 5) e o total de espermatozoides anormais é inferior a 30% (CBRA, 1998). Segundo BARBOSA et al. (2005), na interpretação da morfologia espermática de touros, deve-se considerar para defeitos maiores o limite de 20% e para o total de defeitos, ou seja, para a soma de defeitos maiores e de defeitos menores, deve-se considerar o limite de 30%.

O julgamento de sêmen congelado para reprodutores bovinos no Brasil baseia-se no critério estabelecido pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Portaria SDR 05/09/96; nº 005/1996). Este critério considera fora do padrão a partida de sêmen que apresentar, após descongelação entre 35 a 37°C, por um tempo mínimo de 30 segundos (ou conforme recomendações do estabelecimento produtor), uma das seguintes características: a) volume da dose inferior a 0,25 mL; b) percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva inferior a 30%; c) vigor inferior a 3 (na escala de 0 - 5); d) defeitos totais acima de 30% e defeitos maiores acima de 20% (para doses de, no mínimo, 10×10^6 espermatozoides com motilidade progressiva); e) defeitos totais acima de 20% e defeitos maiores acima de 10% (para doses com 6 a $< 10 \times 10^6$ espermatozoides com motilidade progressiva); (CBRA, 1998).

Na maioria dos laboratórios, ainda hoje, a classificação em defeitos maiores e defeitos menores segue o protocolo descrito por BLOM (1973), onde: a) Defeitos maiores: defeito no acrossoma, gota citoplasmática proximal, cabeça estreita na base, cabeça subdesenvolvida, cabeça isolada patológica, cabeça pequena anormal, contorno anormal, "pouch formation", cauda enrolada na cabeça, cabeça piriforme, formas teratológicas, defeitos da peça intermediária, cauda fortemente dobrada ou enrolada e cauda dobrada com gota distal; b) Defeitos menores:

cabeça delgada, cabeça gigante, cabeça curta, cabeça larga, cabeça pequena normal, cabeça isolada normal, cauda abaxial, retroaxial ou oblíqua, cauda dobrada ou enrolada, gota citoplasmática distal.

1.2.5.2. Teste Hipo-osmótico (“Hypoosmotic Swelling Test”; HOST)

O teste hipo-osmótico é um método simples e muito utilizado para avaliar a integridade funcional da membrana das células espermáticas (REVELL e MRODE, 1994; CORREA et al., 1997; SIQUEIRA et al., 2007).

Uma das propriedades da membrana celular é o transporte seletivo de moléculas que pode ser observado quando a célula é exposta a condições hipo-osmóticas. Nesta situação, a água entra para o meio intracelular até que o equilíbrio osmótico tenha sido estabelecido. Entretanto, esse processo ocorre somente nas células que possuem a membrana plasmática íntegra e viável. Logo, o influxo de água causa edema celular nos espermatozoides viáveis, fenômeno que pode ser visualizado pela observação do enrolamento na região da cauda, local de maior susceptibilidade (JEYENDRAN et al., 1984).

Para se determinar a porcentagem de células apresentando membrana plasmática viável neste teste (células positivas para HOST), realiza-se o cálculo da porcentagem de espermatozoides apresentando alterações na região da cauda após teste hipo-osmótico, subtraindo-se deste valor, a porcentagem de alterações na região da cauda dos espermatozoides antes do teste hipo-osmótico (REVELL e MRODE, 1994).

1.2.5.3. Teste de Termo-resistencia (TTR)

O Teste de Termo-resistência (TTR) consiste basicamente na incubação de uma amostra de sêmen descongelado, em banho-maria, por tempo pré-estabelecido, sob determinada temperatura, avaliando-se a motilidade progressiva em diferentes momentos pós-incubação (DIMITROPOULOS, 1967). Assim, diversos testes foram desenvolvidos com o intuito de avaliar a capacidade do espermatozoide em manter sua motilidade após longos períodos (DIMITROPOULOS, 1967; BARNABE et al., 1980; NAGY et al., 2004).

De maneira geral, o TTR tem o objetivo de verificar a longevidade pós-descongelação das amostras seminais (ARRUDA, 1988; ARRUDA et al., 1992; ARRUDA et al., 1997; VISHWANATH e SHANNON, 1997), podendo ser considerado como teste complementar de qualidade de sêmen descongelado, segundo as normas de comercialização publicada pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento, portaria nº 005/1996 (CBRA, 1998).

De acordo com o CBRA (1998), denomina-se “Teste de Termo-resistência Lento” a prova que consiste na incubação de uma amostra de sêmen em banho-maria, à 38°C, durante 5 horas, avaliando-se a percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva ao final do teste. Por outro lado, o “Teste de Termo-resistência Rápido” é a prova que consiste na incubação da amostra de sêmen em banho-maria, à 46°C, durante 30 minutos. O CBRA (1998) considera de boa qualidade a amostra que apresentar pelo menos 15% de espermatozoides com motilidade progressiva ao final do TTR lento ou rápido.

ARRUDA (1988) verificou taxas de prenhez semelhantes para os tratamentos do TTR rápido e lento. Portanto, o autor concluiu que é possível utilizar o TTR rápido, para avaliar com maior rapidez o poder fecundante do sêmen descongelado, desde que sejam obedecidas às normas fixadas para congelação do sêmen bovino.

Acreditando-se existir associação da resistência dos espermatozoides com importantes implicações fisiológicas e práticas, NAGY et al. (2004) avaliaram a ocorrência de alterações degenerativas nas membranas plasmática e acrossomal após a morte celular de células submetidas a um ambiente de incubação. Para tal, as alterações espermáticas do sêmen descongelado de touros foram analisadas por meio de avaliações repetidas, em intervalos de 30 minutos, nas amostras incubadas à 37°C durante 4 horas. Os autores observaram que a população de espermatozoides vivos e com acrossomo intacto diminuiu discretamente ao longo do período de incubação.

Entretanto, recentemente VIANNA et al. (2009), concluíram que o TTR rápido e lento não mimetiza as condições uterinas e a sobrevivência dos espermatozoides no trato genital da vaca, e não deve ser utilizado para predizer a fertilidade das amostras de sêmen. Segundo os autores, existe grande influência das várias substâncias presentes no trato genital da vaca, que possuem papel fundamental no metabolismo e na sobrevivência dos espermatozoides até o momento da fertilização.

1.2.5.4. Análise computadorizada do movimento espermático

Nas últimas décadas, diversos sistemas de análise computadorizada do movimento espermático (“*Computer Assisted Sêmen Analyses*” - CASA) têm sido propostos e aplicados na tentativa de se aumentar a acurácia e a objetividade da avaliação convencional do sêmen (VERSTEGEN et al., 2002).

O sistema CASA refere-se a um sistema automatizado (“hardware e software”) que visualiza e digitaliza imagens sucessivas dos espermatozoides móveis. Estas são posteriormente identificadas e analisadas e, desta forma, a trajetória espermática é estabelecida. Os resultados desses processamentos são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozoide. Portanto, apesar do seu alto custo, o sistema CASA possibilita melhor detalhamento da qualidade do sêmen analisado, fornecendo informações rápidas e precisas, bem como detalhes adicionais sobre diversas características do movimento dos espermatozoides na amostra (FARREL et al., 1998).

De maneira geral, as variáveis da cinética espermática avaliadas pelo sistema CASA são (ARRUDA, 2000): a) Motilidade total (MT): razão das células móveis no total de espermatozoides da amostra (%); b) Motilidade progressiva (PM): razão das células móveis com movimento progressivo no total de espermatozoides da amostra (%); c) Velocidade de trajeto (VAP): indica a velocidade média ininterrupta do caminho da célula ($\mu\text{m/s}$); d) Velocidade progressiva (VSL): indica a velocidade média percorrida em linha reta entre o início e o final do percurso ($\mu\text{m/s}$); e) Velocidade curvilínea (VCL): indica a velocidade média de cada ponto atual do trajeto seguido por cada célula ($\mu\text{m/s}$); f) Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH): corresponde à largura média

da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento (μm); g) Freqüência de batimento (BCF): definida como a frequência com que a cabeça do espermatozoide move-se durante o trajeto percorrido (Hz); h) Retilinearidade (STR): indica o afastamento da trajetória da célula espermática considerando-se uma linha reta (%); i) Linearidade (LIN): indica o afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta (%); j) Células rápidas (RAPID): indica a porcentagem de células rápidas na amostra (%).

1.2.5.5. Análises espermáticas por citometria de fluxo

Os espermatozoides são constituídos por vários compartimentos inclusos dentro de membranas celulares que devem permanecer intactas e funcionais para garantir proteção e competência celular. Assim, a integridade das membranas é um requisito essencial para a funcionalidade das diversas estruturas espermáticas e para o processo de fertilização (ÕURA & TOSHIMORI, 1990). Considera-se, portanto, que a avaliação de diferentes aspectos relacionados à fisiologia espermática garante melhor estimativa da qualidade seminal (CELEGHINI et al., 2007; ARRUDA et al., 2011).

Avanços recentes na tecnologia de coloração têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozoides (ARRUDA et al., 2007). Dessa forma, a funcionalidade ou integridade das estruturas espermáticas é monitorada por sondas fluorescentes (ou fluorocromos), as quais possuem a capacidade de se ligar e marcar estruturas específicas das células, permitindo um

diagnóstico mais fácil e direto, dependendo de suas características físicas (ARRUDA et al., 2011).

Atualmente, uma variedade de sondas fluorescentes tem sido utilizada, isoladamente ou em associações, na avaliação dos diferentes componentes celulares (GRAHAM et al., 1990; ARRUDA, 2000; CELEGHINI et al., 2007; CELEGHINI et al., 2008; De ANDRADE et al., 2007; LEITE et al., 2010; De ANDRADE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012), seja por microscopia de epifluorescência ou por citometria de fluxo.

Embora avaliações por meio da citometria de fluxo apresentem a principal limitação do alto custo do equipamento, ressalta-se que na microscopia de fluorescência, apesar de menos dispendiosa, geralmente a quantidade de células analisadas não excede o número de 500 por amostra. Portanto, apesar de onerosa, a citometria de fluxo surge como uma técnica vantajosa para avaliação espermática, uma vez que o sistema automatizado tem a capacidade de examinar aproximadamente 30.000 células por minuto, permitindo, dessa forma, resultados mais acurados e fidedignos em curto período (LEITE et al., 2010; ARRUDA et al., 2011; De ANDRADE et al., 2011).

Ressalta-se ainda, que a combinação de vários corantes possibilita a avaliação de diversas estruturas celulares simultaneamente (CELEGHINI et al., 2007). Assim, com o uso das sondas fluorescentes, várias características espermáticas podem ser avaliadas como a integridade de membranas plasmática e acrossomal, o potencial mitocondrial, a translocação de fosfolipídios de membrana, a peroxidação lipídica, entre outras (ARRUDA et al., 2011).

1.2.5.5.1. Avaliação das membranas plasmática e acrossomal

A membrana plasmática atua como uma barreira seletiva entre os meios intra e extracelular sendo responsável pelo mecanismo do equilíbrio osmótico e homeostase celular. Portanto, a membrana plasmática íntegra é essencial para a manutenção da viabilidade e da capacidade fecundante do espermatozoide (ÕURA & TOSHIMORI, 1990).

A integridade da membrana plasmática é usualmente verificada por corantes fluorescentes específicos para DNA que são impermeáveis às membranas intactas. Assim, as células apresentando membrana plasmática lesionada são coradas (CELEGHINI et al., 2007).

Por ser um fluorocromo estável com afinidade específica pelo DNA, o Iodeto de Propídeo (PI) tem apresentado êxito nos resultados, tanto na microscopia de fluorescência quanto no sistema de citometria de fluxo para contagem de células (CELEGHINI et al., 2007; De ANDRADE et al., 2007; LEITE et al., 2010; De ANDRADE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012), corando em vermelho o núcleo de células com danos na membrana plasmática.

Além da integridade da membrana plasmática, a avaliação da integridade acrossomal vem sendo cada vez mais empregada nas análises de qualidade seminal. O acrossomo é uma importante organela espermática preenchida com enzimas hidrolíticas (ÕURA & TOSHIMORI, 1990). A ligação inicial do espermatozoide com a zona pelúcida do ovócito estimula a liberação e ativação das enzimas acrossomais, que caracteriza o evento denominado reação acrossomal. A importância da avaliação do acrossoma se deve, principalmente, ao

fato da membrana acrossomal íntegra ser um fator fundamental para a ocorrência da reação acrossomal e, portanto, para a ocorrência da fecundação (ÕURA & TOSHIMORI, 1990; SILVA e GADELLA, 2006).

O caráter glicoproteico dos componentes acrossomais oferece um interessante meio de se mensurar a integridade do acrossoma, pelo preenchimento da matriz acrossomal com marcadores de glicoproteínas em espermatozoides que apresentem acrossomo lesado. Neste contexto, a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) é uma substância que se liga de forma específica a carboidratos presentes no acrossoma. Esta aglutinina possui afinidade por resíduos glicoproteicos específicos, se associando desta forma, a açúcares α -manosídeos encontrados nos conteúdos acrossomais (CROSS et al., 1986). Porém, para a visualização do acrossomo lesionado, a PSA deve ser conjugada a fluoresceínas, tais como o isotiocionato de fluoresceína (FITC). Assim, o acrossomo lesionado é marcado com sucesso, emitindo fluorescência de coloração verde-amarelada, enquanto a ausência da fluorescência é indicativa de célula com o acrossomo intacto (CROSS et al., 1986; GRAHAM et al., 1990; SILVA & GADELLA, 2006; CELEGHINI et al., 2007). A FITC-PSA tem sido utilizada para avaliar integridade do acrossomo em diversas espécies (GRAHAM et al., 1990; De ANDRADE et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007; LEITE et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012).

Quando a sonda fluorescente PI é utilizada em associação a sonda FITC-PSA, quatro categorias espermáticas são obtidas: a) AIMI: espermatozoides apresentando membranas plasmática e acrossomal intactas [PI (-) e FITC-PSA (-)]; b) AIML: espermatozoides apresentando membrana plasmática lesionada e

membrana acrossomal intacta [PI (+) e FITC-PSA (-)]; c) ALMI: espermatozoides apresentando membrana plasmática intacta e membrana acrossomal lesionada [PI (-) e FITC-PSA (+)]; d) ALML: espermatozoides apresentando membranas plasmática e acrossomal lesionadas [PI (+) e FITC-PSA (+)].

1.2.5.5.2. Avaliação da estabilidade da membrana plasmática

A membrana plasmática passa por grandes modificações para a ocorrência da fertilização (COLENBRANDER et al., 2002). A capacitação espermática é o processo pelo qual o espermatozoide adquire capacidade fertilizante, que fisiologicamente ocorre durante a passagem pelo trato reprodutivo da fêmea (VISCONTI & KOPF, 1998; SARAIVIA et al., 2007; GADELLA, 2008).

Embora as bases moleculares envolvendo todo o processo da capacitação espermática ainda não tenham sido completamente elucidadas, reconhece-se que este é um evento sequencial de alterações bioquímicas que envolvem numerosas mudanças fisiológicas. Alguns dos eventos relacionados com o início da capacitação envolvem a remoção dos fatores periféricos, alterações na fluidez e mudanças na composição lipídica da membrana (VISCONTI & KOPF, 1998; SARAIVIA et al., 2007; GADELLA, 2008). Assim, a capacitação do espermatozoide de mamíferos está associada com a reorganização da membrana plasmática devido à retirada do colesterol e redistribuição de seus fosfolípidos (HALLAP et al., 2006).

A sonda lipofílica Merocianina 540 pode ser empregada para monitorar o nível de desordem dos fosfolípidos da bicamada lipídica da membrana

plasmática, aumentando a intensidade de sua fluorescência com o aumento da desordem, o que pode ser indicativo de células em processo inicial de capacitação. Em estudos laboratoriais, este corante é comumente adicionado ao corante Yo-Pro-1 para a análise simultânea da integridade da membrana plasmática. Isso porque, o Yo-Pro-1 é um corante específico para DNA, impermeável à membrana íntegra, e com excitação e emissão de fluorescência semelhante a da Merocianina 540 (em torno de 540 nm) (COLENBRANDER et al., 2002; HALLAP et al., 2006; SARAVIA et al., 2007).

Portanto, uma vez que a desordem na bicamada lipídica é indicativa da desestabilização da membrana, similar ao que ocorre durante o primeiro passo da capacitação, a coloração Yo-Pro/Merocianina 540 permite identificar duas populações distintas de células viáveis (Yo-Pro-1 negativa): uma que é caracterizada pelas células com emissão de baixa fluorescência e outra que é caracterizada pela alta fluorescência. Os espermatozoides com baixa emissão de fluorescência são considerados não capacitados, enquanto que as células que apresentam alta emissão de fluorescência são consideradas como capacitadas (alto grau de desorganização da bicamada lipídica). Assim, três categorias de células são obtidas nesta análise (ZAFFALON, 2009): a) MPL: espermatozoide com membrana plasmática lesionada (Yo-Pro-1 positiva); b) MIBD: espermatozoide com membrana plasmática íntegra e baixo grau de desorganização da bicamada lipídica; c) MIAD: espermatozoide com membrana plasmática íntegra e alto grau de desorganização da bicamada lipídica.

1.2.5.5.3. Avaliação da peroxidação lipídica da membrana plasmática

O estresse oxidativo é reconhecidamente um importante fator que contribui para a redução da funcionalidade espermática (BROUWERS & GADELLA, 2003; NEILD et al., 2005; AITKEN et al., 2007; KASIMANICKAM et al., 2007).

Os espermatozoides são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo devido a sua grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (AITKEN et al., 2007). A excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) leva à peroxidação dos lipídeos de membrana (peroxidação lipídica) que tem como consequência a perda de integridade de membrana, alteração da funcionalidade celular e diminuição da motilidade espermática, podendo ser uma importante causa da diminuição de fertilidade (STOREY, 2008).

Tendo em vista que a excessiva produção de EROs pode gerar alterações da qualidade espermática como oxidação de proteínas, lesão de DNA e queda nos índices de fertilidade (WATERHOUSE et al., 2010), torna-se plausível especular que a quantificação das EROS e/ou da peroxidação lipídica pode contribuir para o esclarecimento das diferenças nos índices de fertilidade alcançados por diferentes amostras seminais.

A sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591} (4,4-difluoro-5-[4-fenil-1,3-butadienil]-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-ácido undecanóico) tem sido aplicada com sucesso para detecção da peroxidação lipídica em espermatozoides viáveis (BROUWERS & GADELLA, 2003). Esta sonda é um análogo de ácido graxo poli-insaturado, que se incorpora prontamente na membrana celular (NEILD et al., 2005). Após a exposição à EROS, a sonda C11-BODIPY^{581/591} responde ao ataque

de radicais livres com uma mudança irreversível na emissão de sua fluorescência, que se altera do vermelho para o verde (NEILD et al., 2005; AITKEN et al., 2007).

Assim, esta sonda lipofílica permite a identificação de espermatozoides cuja membrana sofreu intenso ataque de EROs, alterando a sua fluorescência. Enquanto este fluoróforo está praticamente intacto, é observada fluorescência vermelha, ao passo que, com a sua peroxidação, há mudança de fluorescência para verde, que pode ser detectada pelo citômetro de fluxo (BROWNSERS & GADELLA, 2003; SILVA & GADELLA, 2006).

A coloração com a sonda C11-BODIPY^{581/591} geralmente é utilizada associada a corantes de DNA como o PI ou H342, para que as células com membrana plasmática lesionada sejam excluídas da avaliação final. Assim, com esta técnica é possível detectar, dentre os espermatozoides com membrana íntegra, duas populações de células (ZAFFALON, 2009): a) MINP: espermatozoides com membrana plasmática íntegra e reduzida peroxidação lipídica (células não peroxidadas; baixa emissão de fluorescência); b) MIP: espermatozoides com membrana plasmática íntegra e elevada peroxidação lipídica (células peroxidadas; alta emissão de fluorescência).

1.2.5.6. Análise computadorizada da morfometria e estrutura cromatínica

Os espermatozoides de mamíferos contêm a cromatina em seu maior grau de compactação. Quando a cromatina encontra-se pouco condensada, o DNA espermático fica mais suscetível à danos e/ou alterações (BALHORN et al., 1999).

Uma vez que alterações cromatínicas podem afetar tanto a funcionalidade espermática quanto o desenvolvimento embrionário normal (BALHORN et al., 1999), a compactação inadequada do DNA pode representar implicações importantes para a fertilidade do macho. Neste sentido, investigações realizadas por WATSON (2000) apontam espermatozoides com DNA danificado como uma das principais causas de falha na fertilização pós IA.

Além disso, visto que nos mamíferos, a cabeça dos espermatozoides é composta quase que totalmente por cromatina, anormalidades morfológicas podem ser também observadas devido à ocorrência de alterações na estrutura cromatínica (OSTERMEIER et al., 2001a; 2001b).

Um dos métodos empregado para avaliação da cromatina foi desenvolvido por MELLO (1982), o qual emprega um corante catiônico metacromático denominado Azul de Toluidina. Esta substância cora seletivamente os grupos ácidos de componentes teciduais, apresentando alta afinidade pelo DNA das células que se coram profundamente (MELLO, 1982). Para a caracterização de espermatozoides corados com Azul de Toluidina, a utilização de análises de imagem computadorizada garante menor subjetividade nas avaliações e permite que a análise morfométrica seja realizada concomitantemente com a avaliação da cromatina (BELETTI et al., 2004).

Nesta técnica, após a coloração do esfregaço, imagens digitais de pelo menos 100 espermatozoides são obtidas para cada amostra, por meio de microscópio óptico acoplado a uma câmera digital, e conectado a um microcomputador. As imagens são capturadas digitalmente em tons de cinza (BELETTI & COSTA, 2003). Posteriormente, as imagens dos espermatozoides

são avaliadas por algoritmos desenvolvidos em ambiente de programação matemática (ambiente SCILAB; SIP toolbox: “*Scilab Image Processing toolbox*”), pela quantificação dos pixels de cada imagem. As seis cabeças espermáticas com menor valor de pixel são consideradas o padrão da amostra. Essas células que são as menos coradas são, teoricamente, as células com cromatina mais compactada (BELETTI et al., 2005a; 2005b).

Assim, a diferença entre o valor padrão da amostra e a média dos valores de pixel de cada cabeça analisada é transformada em porcentagem (Dif%), indicando o percentual de espermatozoides com cromatina considerada descompactada na amostra. Adicionalmente, calcula-se o coeficiente de variação (CV) da intensidade de tons de cinza de cada cabeça, o qual representa quantitativamente a heterogeneidade da compactação da cromatina na cabeça espermática (BELETTI et al., 2005a; 2005b; KANAYAMA & BELETTI, 2011).

Ainda nesta técnica, a área, o perímetro, a largura, o comprimento, a relação comprimento:largura, a elipsidade e o fator forma de todas as cabeças são também determinados por cálculos matemáticos, realizados com algoritmos desenvolvidos em ambiente SCILAB. Da mesma forma, a simetria lateral e a simetria antero-posterior da cabeça espermática é mensurada para identificação de assimetrias ao longo dos eixos principais do espermatozoide (BELETTI et al., 2005a; 2005b). Assimetrias desta natureza podem implicar em alterações nas propriedades hidrodinâmicas da célula (BELETTI et al., 2004). Este cálculo envolve o “dobramento” da cabeça ao longo de seus eixos (vertical e horizontal), de modo a identificar a área de sobreposição entre as áreas “original” e “dobrada” conforme descrita por COSTA & CESAR (2001).

Em adição a estas mensurações, descritores Fourier também são calculados na análise da morfometria espermática. Estes índices caracterizam a curvatura do perímetro espermático pela mensuração de medidas multivariadas da forma da cabeça do espermatozoide (OSTERMEIER et al., 2001a; 2001b). Essas mensurações matemáticas, conhecidas como amplitudes harmônicas, são capazes de descrever objetivamente o formato do núcleo espermático, identificando anormalidades nos mesmos (OSTERMEIER et al., 2001b).

A análise de amplitude harmônica de forma (índices Fourier) há muito tempo é utilizada para monitorizar alterações graduais no formato de grãos de areia. Ainda, é um meio para discriminar populações de sedimentos com sutis diferenças entre si (EHRlich & WEINBERG, 1970). Esta técnica também tem sido usada com sucesso, de diversas maneiras, para avaliar diferenças morfológicas em pequenos crustáceos (KAESLER & WATERS, 1972), células epiteliais (KIELER et al., 1984) e asas de mosquitos (ROHLF & ARCHIE, 1984), bem como alterações nucleares e citoplasmáticas em embriões murinos (MYSTKOWSKA et al., 1991). Segundo OSTERMEIER et al. (2001b), apesar do sucesso das análises de Fourier, muitos pesquisadores continuam a preferir as medidas de comprimento, largura, área e perímetro para distinguir formatos de cabeças espermáticas. As razões para isso são, provavelmente, o fato da análise Fourier ser intensamente computadorizada e envolver uma matemática relativamente complicada. Além disso, as variáveis de forma geradas pelas análises de Fourier são difíceis de conceituar (OSTERMEIER et al., 2001b).

Entretanto, dois interessantes estudos realizados por OSTERMEIER et al. (2001a; 2001b) evidenciaram a importância das análises Fourier em caracterizar o

formato de espermatozoides bovinos. OSTERMEIER et al. (2001b) demonstraram que as análises Fourier foram capazes de detectar alterações na estrutura da cromatina espermática. Ainda, de acordo com OSTERMEIER et al. (2001a), diferenças nos índices Fourier da cabeça espermática foram identificadas em touros de alta e baixa fertilidade, dentre os touros avaliados.

Assim, mais estudos avaliando as mensurações cromatínicas e morfométricas de espermatozoides devem ser incentivados a fim de melhor compreender a importância destas variáveis na capacidade fertilizante das células espermáticas.

1.3. HIPÓTESES

A presente tese se baseou nas seguintes hipóteses:

- A sequência de inseminação, após descongelamento simultâneo de diversas palhetas de sêmen, pode influenciar a taxa de concepção de um programa de IATF, bem como a qualidade seminal *in vitro* das mesmas;
- A taxa de concepção de um programa de IATF, assim como as características *in vitro* do sêmen utilizado, pode variar de acordo com o touro;
- Utilizando-se clássicas e modernas análises seminais *in vitro*, é possível selecionar um grupo de características espermáticas consideradas mais importantes na predição da fertilidade *in vivo*.

1.4. OBJETIVOS

Com o intuito de fornecer informações que pudessem ajudar os pesquisadores a entender as principais causas das diferenças na fertilidade a campo comumente observada entre touros, e a influência da qualidade seminal na mesma, o presente estudo teve por objetivo:

- Determinar o efeito da sequência de inseminação, após descongelamento simultâneo de diversas palhetas de sêmen, na taxa de concepção da IATF e na qualidade seminal *in vitro*;
- Investigar a fertilidade *in vivo*, bem como diversas características espermáticas *in vitro*, do sêmen dos diferentes touros utilizados no mesmo programa de IATF;
- Identificar, dentre as diversas análises de qualidade seminal avaliada *in vitro*, o grupo de características espermáticas consideradas importantes na predição da fertilidade *in vivo* de um programa de IATF.

1.5. DESCRIÇÃO PRELIMINAR DOS CAPÍTULOS II, III e IV

A fim de investigar essas questões aqui levantadas, o presente experimento foi realizado em duas etapas.

A primeira etapa consistiu em um estudo a campo delineado para determinar o efeito do descongelamento simultâneo de palhetas seminais, bem como a taxa de concepção após IATF de vacas pós-parto da raça Nelore, utilizando sêmen de três touros da raça Angus.

A segunda etapa consistiu em um estudo laboratorial delineado para investigar inúmeras características espermáticas das doses de sêmen utilizadas no respectivo programa de IATF, utilizando as mesmas condições de descongelamento do estudo a campo.

Desta forma, o presente estudo resultou na elaboração de três manuscritos, de acordo com cada objetivo específico anteriormente discriminado, que estão dispostos em diferentes capítulos da presente tese.

II. CAPÍTULO 2 - EFEITO DA SEQUÊNCIA DE INSEMINAÇÃO APÓS DESCONGELAMENTO SIMULTÂNEO DE DIVERSAS PALHETAS DE SÊMEN NA TAXA DE CONCEPÇÃO À IATF DE VACAS NELORE PÓS-PARTO*

*Capítulo baseado no artigo científico aceito para publicação no periódico “Theriogenology” (DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.07.007)

Effect of sequence of insemination after simultaneous thawing of multiple semen straws on conception rate to timed-AI in suckled multiparous Nelore cows

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da sequência de inseminação após descongelamento simultâneo de várias palhetas de sêmen na taxa de concepção após Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) de vacas Nelore pós-parto. Adicionalmente, avaliou-se o impacto deste ambiente de descongelamento nas características espermáticas *in vitro*. Para a realização deste estudo, todos os animais (n = 944) receberam o mesmo protocolo de IATF. Dez palhetas de sêmen de 0,5 mL foram descongeladas simultaneamente em banho-maria, à temperatura de 36°C, pelo tempo mínimo de 30 segundos, sendo utilizada uma palheta para cada vaca na IATF. Para as análises laboratoriais, doses de sêmen das mesmas partidas utilizadas no experimento de campo foram avaliadas. De acordo com o experimento a campo, seis minutos e 29 segundos foi o tempo médio que as dez palhetas de sêmen permaneceram no banho-maria. Assim, no laboratório, 6,5 minutos após a retirada da primeira palheta (Palheta1-Lab), duas outras palhetas

foram retiradas do descongelador para avaliar a qualidade seminal da última palheta (Palheta10-Lab). As seguintes características espermáticas foram analisadas: motilidade espermática, termo-resistência após 2 horas de incubação, integridade de membranas plasmática e acrossomal, peroxidação lipídica, estrutura cromatínica e morfometria espermática. De acordo com a análise de regressão logística (GLIMMIX), não foi observado efeito de lote, escore de condição corporal (ECC), inseminador e touro sobre a taxa de concepção ($P > 0,05$). Entretanto, efeito significativo de interação entre touro e grupo de palheta ($P = 0,002$) foi detectado. Redução da taxa de concepção ($P < 0,05$) associada ao grupo de palhetas apresentando maior intervalo entre descongelamento até IA foi observado em apenas um touro. Os resultados do experimento laboratorial foram avaliados pelo teste t-pareado, separadamente por touro. Para o touro 1, que foi o único touro no qual a fertilidade a campo foi afetada pela sequência de inseminação, um efeito de grupo de palheta foi observado como tendência ($P = 0,059$), apenas na variável L/C (razão largura:comprimento) da análise morfométrica. Concluiu-se que a sequência de inseminação após descongelamento simultâneo de dez palhetas de sêmen pode afetar diferentemente a taxa de concepção à IATF, dependendo do touro que é utilizado. Porém, os efeitos deste ambiente de descongelamento nas características espermáticas *in vitro*, que poderia explicar a redução da fertilidade *in vivo* do sêmen, não foi elucidado.

Palavras chave: características seminais, descongelamento simultâneo, IATF, Nelore, taxa de concepção.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of sequence of insemination after simultaneous thawing of multiple 0.5 mL semen straws on conception rate at timed-AI in suckled multiparous Nelore cows. The effect of this thawing procedure on *in vitro* sperm characteristics was also evaluated. All cows (n = 944) received the same timed-AI protocol. Ten 0.5 mL frozen straws from the same batch were thawed simultaneously in an electric water-bath unit, at 36 °C, for a minimum of 30 s. One straw was used for each cow at timed-AI. For laboratory analyses, the same semen batches used in field experiment were evaluated. According to field experiment, 6 min and 29 s was the mean time that ten straws remained in the thawing bath. Thus, 6.5 min after the removal of the First Straw Group, two other straws was removed to evaluate the semen quality of the Last Straw Group. The following sperm characteristics were analyzed: sperm motility, sperm thermal resistance after 2 hours incubation, plasma and acrosomal membrane integrity, lipid peroxidation, chromatin structure and sperm morphometry. According to logistic regression (GLIMMIX procedure) there were no effect of breeding group, body condition score, AI technician, and sire on conception rate ($P > 0.05$). On the other hand, an interaction between sire and straw group ($P = 0.002$) was detected. Semen from only one bull was observed to obtain diminished ($P < 0.05$) field fertility for the group of straws associated with the longest interval from thawing until AI. However, the results of laboratory experiment were not able to elucidate the findings of field experiment. The paired T-test was performed separated by bull. For bull 1, which was the single bull that field fertility was affected by sequence of insemination, an effect of straw group was observed as a trend, only in the variable

W/L (width:length ratio) of morphometric analysis ($P < 0.06$). It was concluded that sequence of insemination after simultaneous thawing of ten semen straws can differently affect conception rates at timed-AI, depending on which bull is used. Nevertheless, the effects of this thawing bath environment on *in vitro* sperm characteristics, which could explain the impairment of *in vivo* semen fertility, remains to be further investigated.

Keywords: Conception rate, Nelore, timed-AI, sêmen characteristics, simultaneous thawing

1. Introdução

Os programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) representam uma alternativa bem estabelecida para facilitar a aplicabilidade da IA e melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos bovinos (SÁ FILHO et al., 2010). Nas últimas duas décadas, diversos tipos de protocolos de IATF têm sido mundialmente utilizados como ferramenta de manejo reprodutivo para fazendas de gado de corte e de leite (PURSLEY et al., 1995; THATCHER et al., 1996; PURSLEY et al., 1998; BÓ et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004; CHEBEL et al., 2006; GALVÃO et al., 2007; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ-FILHO et al., 2009; BISINOTO et al., 2010; SÁ-FILHO et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2011).

Na América do Sul, os programas de IATF com estrógenos e progestágenos são os métodos mais comumente utilizados nas fazendas comerciais de gado de corte (BÓ et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004;

MADUREIRA & PIMENTEL, 2005; MENEGHETTI et al., 2009). Estes protocolos proporcionam alto grau de sincronização da ovulação, possibilitam o manejo simultâneo de grande número de vacas, possuem a capacidade de induzir a ciclicidade em vacas de corte lactantes e em anestro e reduzem a mão de obra dos programas reprodutivos (MADUREIRA & PIMENTEL, 2005).

Entretanto, uma vez que o tamanho dos rebanhos e o uso dos protocolos de IATF aumentam continuamente no Brasil, o número de vacas que precisam ser inseminadas em curto período de tempo também aumenta. Por esta razão, inseminadores precisam ser mais rápidos e eficientes.

Os fatores acima descritos têm resultado na prática rotineira do descongelamento simultâneo de várias palhetas de sêmen na mesma unidade de descongelamento. Esta técnica facilita o manejo do sêmen e o número de vacas inseminadas em curto período. Ressalta-se, entretanto, que sob essas condições algumas palhetas permanecem no descongelador enquanto as demais inseminações são realizadas, de modo que o banho-maria poderia atuar como um ambiente de incubação para o sêmen. Assim sendo, o ambiente térmico de descongelamento poderia influenciar a viabilidade e, portanto, a fertilidade do espermatozoide (BROWN et al., 1991).

Embora os fatores relativos à fêmea bovina que influenciam o sucesso dos programas de IATF têm sido intensamente estudados (MADUREIRA & PIMENTEL, 2005; PERRY et al., 2007; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009; GALVÃO & SANTOS, 2010), os fatores relacionados com a qualidade do sêmen utilizado nos programas de IA não têm recebido a mesma atenção.

Desta forma, com o objetivo de se determinar o efeito do descongelamento simultâneo de várias palhetas de sêmen na taxa de concepção e nas características espermáticas *in vitro*, dois experimentos foram realizados. O primeiro experimento foi um estudo de campo delineado para determinar o efeito da sequência de inseminação, após descongelamento simultâneo de dez palhetas de sêmen, na taxa de concepção após IATF de fêmeas pluríparas pós-parto da raça Nelore. O segundo experimento foi um estudo laboratorial delineado para avaliar diversas características espermáticas *in vitro* das doses de sêmen submetidas a este procedimento de descongelação, utilizando as mesmas condições de descongelamento do estudo a campo.

2. Material e Métodos

2.1. Avaliação da taxa de concepção – experimento a campo

2.1.1. Animais e manejo

Este estudo foi realizado em uma fazenda comercial de gado de corte, no município de Nova Xavantina, no estado do Mato Grosso, localizada a uma latitude 15°05'39,4" sul e longitude 52°02'26,7" oeste. Os dados utilizados no presente estudo foram coletados de dezembro de 2010 a Janeiro de 2011 durante a estação de monta determinada pela fazenda.

O município de Nova Xavantina é caracterizado por um clima Tropical quente e sub-úmido, com 4 meses de seca, de maio a agosto. A precipitação anual de chuva é de aproximadamente 1.700 mm, com intensidade máxima em dezembro, janeiro e fevereiro. O total de precipitação de chuva (e o total

acumulado), de cada mês, durante o período experimental registrados na fazenda, foi: 170 mm em novembro de 2010 (total acumulado 330 mm), 199 mm em dezembro de 2010 (total acumulado: 529 mm) e 281 mm em janeiro de 2011 (total acumulado 809 mm). A temperatura média anual é de 24°C, sendo a maior máxima 38°C, durante o verão (dezembro a fevereiro), e a menor mínima 0°C, durante o inverno (junho a agosto). Durante o período experimental (verão) a média mensal ficou em torno de 31°C, variando entre 25°C e 37°C.

Neste estudo, utilizaram-se apenas vacas pluríparas lactantes, da raça Nelore (n = 944). Na respectiva fazenda, todos os animais foram mantidos em pasto composto por *Brachiaria brizantha* ou *Brachiaria decumbens*, suplementados com sal mineral e livre acesso à água. Os animais utilizados apresentavam idade entre 4 e 10 anos ($8,10 \pm 2,14$) e ECC entre 1,75 e 3,25 ($2,22 \pm 0,43$), em uma escala de 1 a 5 (onde 1 = muito magra e 5 = obesa; segundo HOUGHTON et al., 1990).

2.1.2. Manejo Reprodutivo

Após o parto, as vacas lactantes foram distribuídas em 8 lotes de aproximadamente 120 animais cada, de acordo com a data de parição. Para primeiro serviço, todas as vacas (n = 944) receberam o mesmo protocolo de IATF começando 30 a 40 dias pós-parto. O protocolo de IATF se iniciou (dia 0) com as vacas recebendo um dispositivo intravaginal liberador de P4 (Sincrogest[®], Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil), de primeiro ou segundo uso, e uma injeção intramuscular (i.m.) de 2,0 mg de Benzoato de Estradiol (BE; SincrodioI[®], Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil). O dispositivo de P4 foi removido 8 dias

após (dia 8), quando os animais receberam injeções (i.m.) de: 500 µg de d-cloprostenol (PGF2α; Sincrocio[®], Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil), 300 UI de eCG (Novormon 5000[®], Intervet Schering Plough Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 0,5 mg de Cipionato de estradiol (ECP[®], Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Dois dias após remoção do dispositivo (dia 10), as vacas foram inseminadas (IATF) por dois inseminadores experientes. O dia das IATFs foi diferente para cada lote de animais inseminados. O tipo de dispositivo de P4 (primeiro ou segundo uso), ECC (1 a 5) e inseminador (1 e 2) foram anotados para cada animal.

Os primeiros quatro lotes de vacas (n = 477) receberam apenas dispositivos de P4 de primeiro uso (novos). Os outros quatro lotes restantes receberam apenas dispositivos reutilizados (segundo uso; n = 467). Desta forma, garantiu-se que o número de vacas recebendo dispositivos novos ou usados fosse muito semelhante.

2.1.3. Delineamento experimental

No presente experimento, utilizaram-se doses congeladas de três diferentes touros da raça Angus, sendo adquiridas três partidas de cada touro (n=9). Todas as doses foram oriundas da mesma empresa e diluídas no mesmo meio à base de leite. Aproximadamente 100 doses de cada partida foram utilizadas.

O manejo e o protocolo de descongelação de sêmen foram baseados nos procedimentos de rotina da fazenda onde o experimento foi conduzido. Nos dias de inseminação, o botijão de nitrogênio contendo o sêmen congelado foi levado para o mesmo local aonde as IAs foram realizadas.

Para cada lote de inseminação, o mesmo procedimento de IATF foi repetido: após uma vaca ser aleatoriamente posicionada no tronco de contenção, dez palhetas de sêmen de 0,5 mL (oriundas da mesma partida) foram descongeladas em banho-maria termostaticamente controlado (descongelador elétrico de sêmen contendo 400 mL de água; Fertilize[®], Fertilize, Uberaba, Brasil), com a temperatura de 36°C, por no mínimo 30 segundos. Trinta segundos após a inserção das dez palhetas de sêmen no descongelador elétrico, uma palheta foi aleatoriamente retirada (Palheta1-IA) e imediatamente utilizada para preparo do aplicador, para que então a primeira inseminação fosse realizada. Enquanto isso, as demais palhetas de sêmen permaneceram no descongelador. Depois de concluída a inseminação com a primeira palheta (Palheta1-IA), outra vaca foi aleatoriamente posicionada no tronco de contenção, outra palheta foi retirada do aplicador, e o aplicador contendo a segunda palheta da sequência foi utilizado (Palheta2-IA). Dessa mesma forma, as demais palhetas foram retiradas do descongelador e utilizadas para IA, até que a décima palheta da sequência fosse utilizada (Palheta1-IA até Palheta10-IA). E assim sucessivamente.

Uma pessoa experiente foi exclusivamente designada para a manipulação do sêmen e outra apenas para o preparo do aplicador. Desta forma, garantiu-se que os dois inseminadores estivessem constantemente prontos para apenas conduzir o aplicador até o animal e realizar as IAs. Os inseminadores sempre se alternavam no mesmo tronco de contenção, realizando uma IA de cada vez. Deste modo, cada técnico inseminou o mesmo número de vacas.

Os procedimentos de descongelamento do sêmen, preparo do aplicador e IATF foram realizados em curral coberto, protegido da incidência direta da luz. O

número da palheta na sequência de inseminação (da Palheta1-IA até a Palheta10-IA) e o momento exato (hora e minuto) da retirada do sêmen do banho-maria foram anotados para cada vaca. Aproximadamente doze grupos de dez doses de sêmen foram descongelados em cada dia de IATF.

O experimento foi conduzido de maneira que o sêmen dos três touros fosse igualmente distribuído entre os lotes, inseminador (1 ou 2), tipo de dispositivo de P4 (primeiro ou segundo uso) e número da palheta na sequência de inseminação (Palheta1-IA até Palheta10-IA). O tanque de nitrogênio era preparado um dia antes de cada dia de IATF, sendo organizado de modo que cada caneco do botijão era identificado com o número de um touro específico. Dentro de cada caneco, cada raque, devidamente identificada, continha uma partida de sêmen específica daquele touro. Assim, garantiu-se que as dez palhetas simultaneamente descongeladas eram oriundas da mesma partida. Da mesma forma, o grupo subsequente de palhetas a ser descongelado era garantido ser de uma partida diferente da partida anteriormente utilizada.

O tempo médio em que cada palheta de sêmen permaneceu no descongelador (da primeira até a décima palheta) foi calculado após o final do experimento a campo, utilizando as anotações das 944 IATFs.

Assim sendo, de acordo com o experimento de campo, e considerando o tempo de descongelamento de 30 segundos como tempo zero, a média de tempo entre a inserção das dez palhetas de sêmen no descongelador até a remoção da décima palheta foi seis minutos e 29 segundos. A média (\pm desvio padrão) e a variação de tempo (mínimo – máximo) que cada palheta permaneceu no descongelador estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Média (\pm desvio padrão) e variação de tempo (mínimo – máximo) que cada palheta da sequência de inseminação permaneceu no descongelador, após descongelamento simultâneo de dez palhetas de sêmen até o momento da IA, considerando o tempo mínimo de descongelamento de 30 segundos como tempo zero.

Palheta na sequência de inseminação	Média \pm desvio padrão (segundos)	Tempo mínimo (segundos)	Tempo máximo (segundos)
Palheta1-IA	0 \pm 0	0	0
Palheta2-IA	49 \pm 43	30	180
Palheta3-IA	92 \pm 46	60	210
Palheta4-IA	141 \pm 56	90	240
Palheta5-IA	180 \pm 59	120	300
Palheta6-IA	228 \pm 65	150	360
Palheta7-IA	266 \pm 79	180	390
Palheta8-IA	306 \pm 86	210	450
Palheta9-IA	346 \pm 90	240	510
Palheta10-IA	389 \pm 97	270	630

Para análise do efeito da sequência de inseminação na taxa de concepção, as 944 vacas foram divididas em três grupos, de acordo com a distribuição de tempo de permanência de cada palheta (1 a 10) no descongelador. O gráfico obtido com a distribuição de tempo, por palheta (Palheta1-IA até Palheta 10-IA), está demonstrado na Figura 1.

Portanto, visto que a maioria das palhetas 1, 2 e 3 foram retiradas do descongelador entre 0 e 2,5 minutos (Figura 1), as vacas inseminadas com as Palheta1-IA, Palheta2-IA e Palheta3-IA foram incluídas no Grupo1-IATF. Visto que a maioria das palhetas 4, 5 e 6 foram retiradas do descongelador entre 2,5 e 5,0 minutos (Figura 1), as vacas inseminadas com as Palheta4-IA, Palheta5-IA e Palheta6-IA foram incluídas no Grupo2-IATF. Da mesma forma, visto que a maioria das palhetas 7, 8, 9 e 10 foram retiradas do descongelador entre 5,0 e 7,5

minutos (Figura 1), as vacas inseminadas com as Palheta7-IA, Palheta8-IA, Palheta9-IA e Palheta10-IA foram incluídas no Grupo3-IATF.

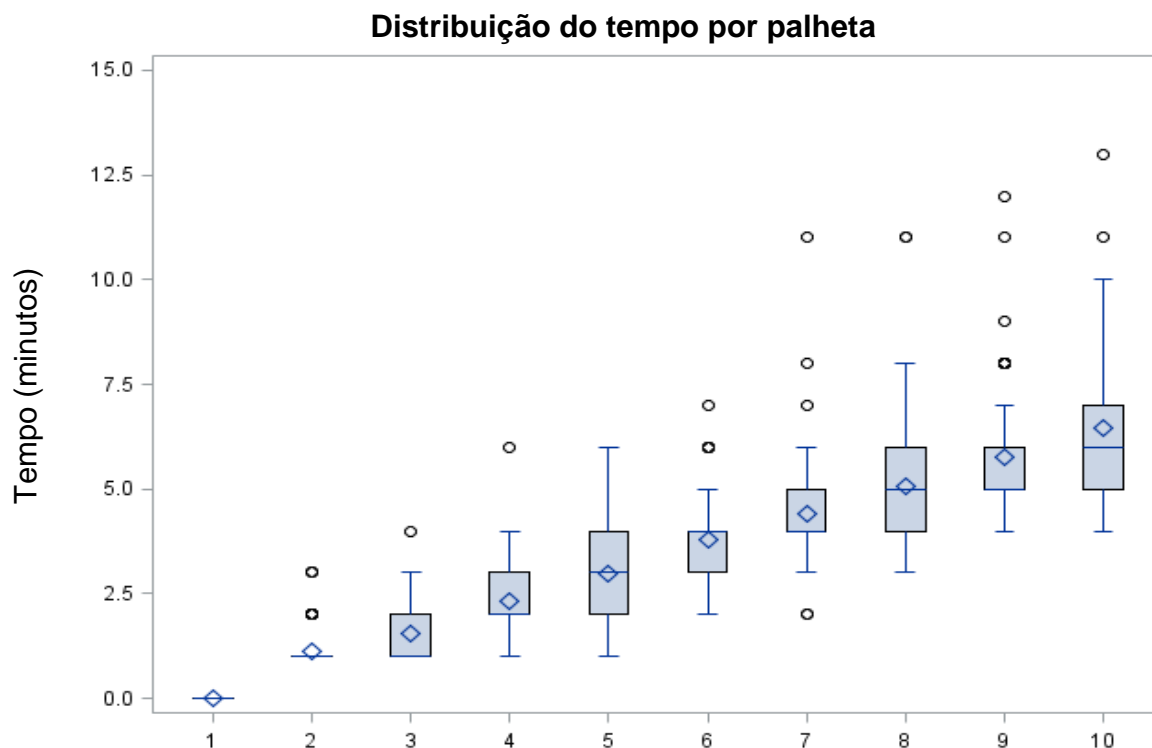


Figura 1. Distribuição do tempo de incubação por palheta (Gráfico *Box-plot*), de acordo com os dados das 944 inseminações, referente ao período de permanência das dez palhetas de sêmen após descongelamento simultâneo, considerando o tempo mínimo de 30 segundos como tempo zero.

Todos os animais foram examinados para diagnóstico de gestação por ultrassonografia transretal 40 dias após IATF. A observação de uma vesícula embrionária com embrião viável (presença de batimento cardíaco) foi utilizada como indicativo de gestação.

2.2. Avaliação laboratorial da qualidade espermática – experimento laboratorial

2.2.1. Delineamento experimental

Doses de sêmen congeladas de cada touro (n = 3) e partidas (n = 3) utilizadas no experimento a campo foram analisadas no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, Pirassununga, SP, Brasil.

Com o intuito de simular o experimento a campo, para cada uma das nove diferentes partidas avaliadas, dez palhetas de sêmen da mesma partida foram descongeladas simultaneamente, em banho-maria elétrico idêntico ao utilizado no experimento de campo (Fertilize[®]), na temperatura de 36°C, por no mínimo 30 segundos. Após trinta segundos, duas palhetas foram retiradas do descongelador (Palheta1-Lab) e o sêmen oriundo dessas duas palhetas foi colocado no mesmo microtubo. As demais palhetas permaneceram no banho-maria. Para avaliar a qualidade seminal da Palheta1-Lab, as seguintes características espermáticas foram analisadas *in vitro*: motilidade computadorizada do movimento espermático, termo-resistência espermática após 2 horas de incubação, integridade das membranas plasmática e acrossomal, peroxidação lipídica, estrutura cromatínica e morfometria espermática. Seis minutos e 29 segundos após a retirada das duas primeiras palhetas do descongelador (Palheta1-Lab), duas outras palhetas (Palheta10-Lab) foram retiradas. O sêmen oriundo dessas duas palhetas foi depositado em microtubo e as mesmas variáveis laboratoriais foram analisadas para Palheta10-Lab.

Como anteriormente descrito, o termostato do descongelador de sêmen é calibrado para que a temperatura do banho-maria seja mantida a 36°C. Entretanto,

uma vez que dez palhetas de 0,5 mL foram descongeladas simultaneamente, a variação da temperatura da água foi um importante fator a ser considerado. Portanto, no laboratório, a temperatura da água foi examinada por termômetro digital (HI147-00, Hanna Instruments, Ann Arbor, EUA) com o objetivo de verificar qualquer variação na temperatura do banho-maria, em função do tempo em que as palhetas permaneceram no ambiente de descongelação.

2.2.2. Análise computadorizada do sêmen (“Computer-Assisted Sêmen Analysis”; CASA)

A motilidade espermática foi analisada pelo sistema CASA (Ivos-Ultimate®; Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, EUA). Ressalta-se, porém, que as amostras de sêmen utilizadas no presente experimento foram todas criopreservadas no mesmo diluidor a base de leite. Avaliações de sêmen bovino diluídos em diluentes a base de leite geralmente apresentam um problema, dada à opacidade do meio que ocorre pela intensa presença de glóbulos de gordura que interferem na visualização dos espermatozoides (VAN DEMARK et al., 1959). Assim, com o intuito de melhorar a visualização dos espermatozoides neste meio, as células espermáticas foram coradas com o Hoechst 33342 (H342; H-1399; Molecular Probes Inc., Eugene, EUA), tornando-se fluorescentes quando luz ultravioleta é incidida sobre elas.

Para as análises realizadas pelo CASA, o corante H342 foi preparado na concentração de 5 mg/mL. O sistema CASA foi pré-ajustado para a configuração “BOVINO” na opção “IDENT” (número de imagens adquiridas: 30; taxa de aquisição das imagens: 60 Hz; contraste mínimo da célula: 50; tamanho mínimo

da célula: 6 pixels; contraste da célula estática: 30; referência de retilinearidade para células progressivas: 60%; referência de velocidade de trajeto para células progressivas: 30 $\mu\text{m/s}$; referência de velocidade retilinear para células progressivas: 20 $\mu\text{m/s}$; tamanho estático da cabeça espermática: 0,23 a 1,91; limite de intensidade estática da célula: 0,56 a 1,20; limite de alongamento da célula: 8 a 92%; aumento: 1,89X; intensidade de iluminação: 2203; temperatura: 37°C; CELEGHINI et al., 2008).

Para avaliação computadorizada do movimento espermático, uma alíquota de 100 μL de sêmen descongelado foi depositado em microtubo e 2 μL de H342 (5 mg/mL) foi adicionado. Essa solução foi incubada a 37°C por 20 minutos. Após incubação, a motilidade espermática foi avaliada depositando-se 6 μL do sêmen corado com H342 em lâmina de leitura padrão (Makler counting chamber, SEFI Medical Instruments LTD, Haifa, Israel) previamente aquecida a 37°C, a qual foi inserida no aparelho Hamilton Thorne do sistema CASA. Seis campos foram aleatoriamente selecionados para cada amostra. As variáveis da cinética espermática analisadas pelo CASA foram: Motilidade Total (MT; %), Motilidade Progressiva (PM; %), Velocidade de Trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), Velocidade Progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), Velocidade Curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), Amplitude Lateral da Cabeça (ALH; μm), Frequência de Batimentos (BCF; Hz), Retilinearidade (STR; %), Linearidade (LIN; %) e Células com Velocidade Rápida (RAPID; %).

2.2.3. Avaliação da termo-resistência espermática após 2 horas de incubação

A avaliação da termo-resistência espermática após 2 horas de incubação foi realizado com o objetivo de verificar a longevidade espermática pós-

descongelamento das amostras seminais. Assim, imediatamente após a palheta ser removida do descongelador, uma alíquota de 250 µL foi retirada da amostra de sêmen descongelado e então depositada em outro microtubo pré-aquecido, ficando este incubado em banho-maria a 37°C durante 2 horas, quando as variáveis do movimento espermático foram avaliadas pelo sistema CASA. Portanto, após 120 minutos de incubação, uma alíquota de 100 µL de sêmen foi retirada e colocada em outro microtubo pré-aquecido para que o mesmo procedimento descrito na seção 2.2.2 fosse realizado. As seguintes variáveis espermáticas foram avaliadas: TM_2h: TM após 2 horas de incubação, PM_2h: PM após 2 horas de incubação, VAP_2h: VAP após 2 horas de incubação, VSL_2h: VSL após 2 horas de incubação, VCL_2h: VCL após 2 horas de incubação, ALH_2h: ALH após 2 horas de incubação, BCF_2h: BCF após 2 horas de incubação, STR_2h: STR após 2 horas de incubação, LIN_2h: LIN após 2 horas de incubação, RAPID_2h: RAPID após 2 horas de incubação.

2.2.4. Análises seminais por citometria de fluxo

As análises da integridade de membranas plasmáticas e acrossomal e da peroxidação lipídica foram realizadas utilizando citômetro de fluxo BD FACSAria® (Becton-Dickinson, San Jose, EUA) equipado com laser "Near" UV de 405 nm e laser de argônio de 488 nm e fotomultiplicadores (PMT) B (Band Pass 450/20), C (Long Pass 595 nm/Band Pass 610/20 nm), D (Long Pass 556 nm/ Band Pass 575/26 nm) e E (Long Pass 502 nm/ Band Pass 530/30 nm).

O citômetro de fluxo foi calibrado utilizando-se duas alíquotas de amostras de sêmen fresco (apresentando motilidade ≥ 80 %). Uma das alíquotas foi

submetida ao congelamento rápido em nitrogênio líquido com o intuito de danificar propositalmente as membranas espermáticas, resultando em grande proporção de espermatozoides lesionados. A outra alíquota foi utilizada como controle apresentando grande proporção de espermatozoides com membranas intactas (De ANDRADE et al., 2011).

As amostras destinadas à análise por citometria foram diluídas em meio TALP (“Tyrode’s Albumin Lactate Pyruvate”) modificado (TALPm) com NaCl (114 mM), KCl (3,2 mM), MgCl₂.6H₂O (0,5 mM), NaH₂PO₄.H₂O (0,4 mM), glicose (5 mM), lactato de sódio (10 mM), piruvato de sódio (0,1 mM) e penicilina sódica (10.000UI/100 mL). O pH do meio foi ajustado com NaOH (1N) até atingir pH 7,4.

Após as colorações para cada análise, as amostras de sêmen diluídas em TALPm foram analisadas no citômetro de fluxo, controlado pelo sistema computacional BD FACSDiva™ 6.0 software (Becton-Dickinson). No citômetro, as amostras foram processadas a uma taxa de aquisição de aproximadamente 600 a 1.000 eventos/segundo, avaliando-se em torno de 10.000 células por análise (LEITE et al., 2010).

2.2.4.1. Avaliação simultânea das membranas plasmática e acrossomal

Para avaliar as células com membranas plasmática e acrossomal intactas, uma alíquota de sêmen foi retirada das amostras e adicionado ao meio TALPm, de modo que as amostras resultantes apresentavam concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL em volume final de 148 uL. Em seguida, 2 uL de H342 (40 ug/mL) foi adicionado para que o DNA das células espermáticas fossem coradas, de modo que apenas os espermatozoides fossem considerados na

amostra. Após 10 minutos de incubação a 37°C, 3 uL de iodeto de propídio (PI, 0,5 mg/mL; 28.707-5; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 10 uL de aglutinina de *Pisum Sativum* conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 ug/mL; L-0770; Sigma-Aldrich St. Louis, EUA) foram adicionados às amostras (CELEGHINI et al., 2007). Após 10 minutos de incubação a 37°C, as amostras foram diluídas com a adição de 150 uL de TALPm em concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL, para serem então analisadas por citometria de fluxo (LEITE et al., 2010; De ANDRADE et al., 2011).

A associação das sondas fluorescentes FITC-PSA gerou quatro populações de células: (1) AIMI: espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas [PI (-), FITC-PSA (-)]; (2) AIML: espermatozoides com membrana plasmática lesionada e membrana acrossomal intacta [PI (+), FITC-PSA (-)]; (3) ALMI: espermatozoides com membrana plasmática intacta e membrana acrossomal lesionada [PI (-), FITC-PSA (+)]; (4) ALML: espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal lesionadas [PI (+), FITC-PSA (+)]. A Figura 2 apresenta um exemplo dos gráficos e histogramas obtidos na presente análise.

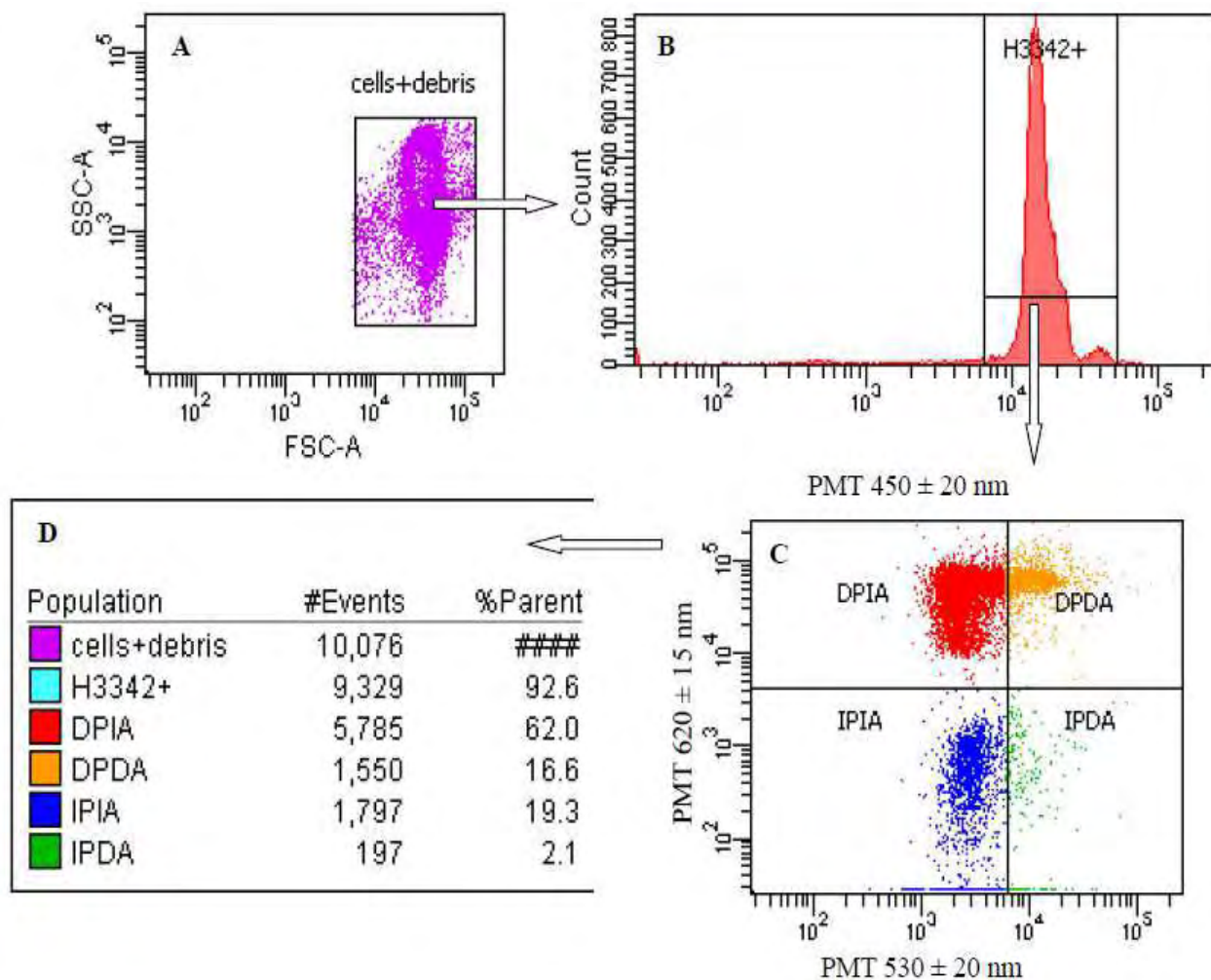


Figura 2. Gráficos e histogramas de espermatozoides bovino analisados por citometria de fluxo. (A) Gráfico "células + debris" contendo as populações de células e de partículas sem DNA; (B) Histograma demonstrando as partículas marcadas com H342 (espermatozoides), oriundas do gráfico A; (C) IPIA = AIMI: população de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras; IPDA = ALMI: população de células com membrana plasmática íntegra e acrossoma danificado; DPIA = AIML: população de células com membrana plasmática lesionada e acrossoma íntegro; DPDA = ALML: população de células com membranas plasmática e acrossomal lesionadas. (D) Porcentagens médias para AIMI (IPIA), ALMI (IPDA), AIML (DPIA) e ALML (DPDA) originadas do gráfico C.

2.2.4.2. Avaliação da peroxidação lipídica

Para avaliação da peroxidação lipídica, uma alíquota foi retirada das amostras e adicionou-se TALPm para se obter amostras com concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL, em volume final de 499,5 μ L. Em seguida, 0,5 μ L da sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591} (1mg/mL, D-3861, Molecular Probes Inc., Eugene, EUA) foi adicionada. Essa amostra foi incubada durante 30 minutos a 37°C. Após este período de incubação, 145 μ L desta solução foi transferida para outro microtubo e adicionou-se 2 μ L de H342 (40 μ g/mL). Esta amostra foi então incubada durante 10 minutos a 37°C. A sonda H342 foi utilizada com o objetivo de evitar que outras partículas apresentando mesmo tamanho e/ou granulosidade que os espermatozoides fossem incluídas na contagem. Assim, após incubação com H342, 3 μ L de PI (0,5 mg/mL) foram adicionados à amostra para que as células com membrana plasmática lesionada fossem identificadas. Em seguida, a amostra foi incubada com PI durante 5 minutos a 37°C. Por fim, a amostra foi diluída com TALPm na concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL.

A coloração pela sonda C11-BODIPY^{581/591} gerou quatro populações de espermatozoides: (1) MINP: células com membrana plasmática íntegra e reduzida peroxidação lipídica [PI (-), C11-BODIPY (-)]; (2) MIP: células com membrana plasmática íntegra e elevada peroxidação lipídica [PI (-), C11-BODIPY(+)]; (3) MLNP: células com membrana plasmática lesionada e reduzida peroxidação lipídica [PI (+),C11-BODIPY(-)]; (4) MLP: células com membrana plasmática lesionada e elevada peroxidação lipídica [PI (+), C11-BODIPY(+)]. A Figura 3 apresenta um exemplo dos gráficos e histogramas obtidos na presente análise.

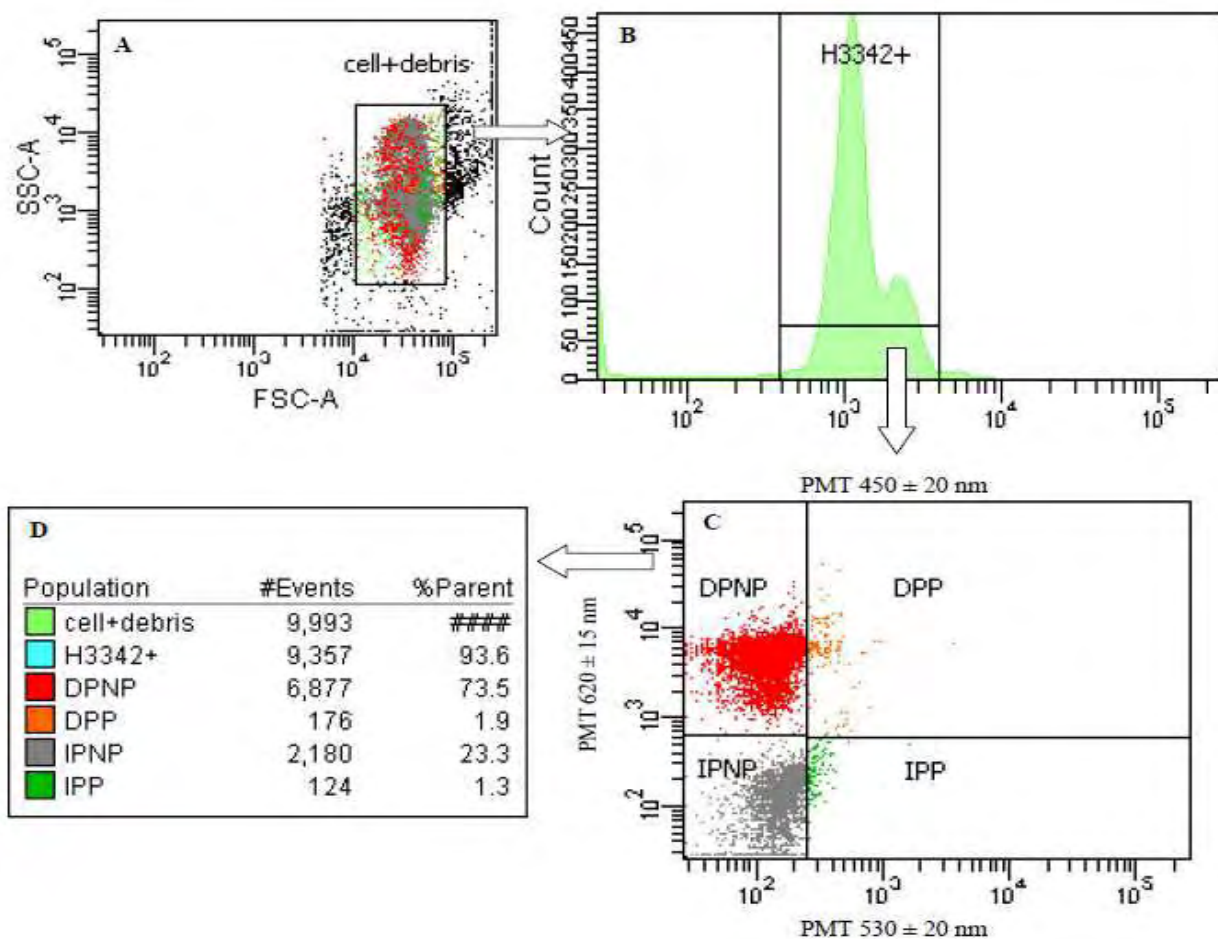


Figura 3. Gráficos e histogramas de espermatozoides bovino analisados por citometria de fluxo. (A) Gráfico "células + debris" contendo as populações de células e de partículas sem DNA; (B) Histograma demonstrando as partículas marcadas com H342 (espermatozoides), oriundas do gráfico A; (C) IPP = MIP: células com membrana plasmática íntegra e elevada peroxidação lipídica; IPNP = MINP: células com membrana plasmática íntegra não peroxidadas; DPNP = MLNP: células com membrana plasmática lesionada não peroxidadas; DPP = MLP: células com membrana plasmática lesionada peroxidadas; (D) Porcentagem dos valores para MIP (IPP), MINP (IPNP), MLNP (DPNP) e MLP (DPP) originadas do gráfico C.

2.2.5. Avaliação da estrutura cromatínica e morfometria espermática

Uma pequena alíquota foi coletada do microtubo contendo o sêmen descongelado e dois esfregaços foram preparados para cada amostra. A avaliação da estrutura cromatínica e morfometria espermática foi realizada posteriormente com esses esfregaços.

Os esfregaços foram fixados com etanol e ácido acético (3:1, V/V), durante 1 minuto, e depois com etanol 70%, durante 3 minutos. Em seguida, os esfregaços foram imersos em solução de hidrólise (HCL 4M) por 25 minutos, lavados em água destilada e secos em temperatura ambiente. Uma gota de Azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine (citrato-fosfato sódico, pH 4,0), foi depositada sobre cada esfregaço e, em seguida, coberta com lamínula.

Para cada lâmina de esfregaço, cinquenta imagens digitais em tons de cinza foram obtidas aleatoriamente utilizando-se microscópio Leica DM500 (Leica Microsystems Inc., BuffaloGrove, EUA) com lente objetiva de 100X acoplada à uma câmera Leica ICC50 (Leica Microsystems Inc., BuffaloGrove, EUA), conectada a um microcomputador. O limiar de segmentação de imagens foi baseado nos estudos de BELETTI & COSTA (2003), obtendo-se pelo menos 100 cabeças espermáticas para cada esfregaço. A segmentação das cabeças espermáticas foi realizada utilizando-se algoritmos desenvolvidos em um programa matemático (SCILAB *software*) pela ferramenta de processamento de imagens (SIP toolbox: "*Scilab Image Processing toolbox*"). Desta forma, as imagens dos espermatozoides foram analisadas para primeiramente se obter o valor médio de pixel a partir do valor de cada cabeça espermática. Seis cabeças com os menores valores de pixel foram automaticamente selecionadas e definidas

como cabeças-padrão. Estas cabeças, teoricamente são as cabeças que apresentam cromatina mais condensada. Subsequentemente, para cada imagem, a diferença entre o valor padrão do esfregaço e o valor médio de cada cabeça analisada foi determinada. Esta diferença foi transformada na percentagem (Dif; %) do valor médio de pixel em relação as cabeças padrão, o que indica a percentagem de descondensação cromatínica. O coeficiente de variação (CV) da intensidade da escala de cinza para cada cabeça, que indica heterogeneidade da cromatina espermática, também foi calculada. Adicionalmente, área, perímetro, largura, comprimento e razão largura:comprimento (L/C) de todas as cabeças espermáticas foram determinados também utilizando-se algoritmos desenvolvidos em ambiente SCILAB. Todos estes índices foram calculados utilizando os procedimentos descritos por BELETTI & COSTA (2003).

2.3. Análises estatísticas

2.3.1. Análise estatística do experimento a campo

Taxa de concepção 40 dias após IATF foi analisada como variável de resposta binária usando regressão logística pelo procedimento LOGISTIC do SAS (versão 9.3, SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA) ajustado com distribuição binária e função das covariáveis (via logit link). As variáveis consideradas nos modelos iniciais como efeitos fixo foram: Lote (1 a 8), ECC ($\leq 2,5$ e $> 2,5$), dispositivo de P4 (primeiro ou segundo uso), inseminador (1 e 2), partida (1, 2 e 3, dentro de cada touro) e touro (1, 2 e 3). Os fatores fixos sequência de palheta (1 a 10) e grupo de palheta (1, 2 e 3) foram utilizados separadamente com as outras variáveis, em diferentes modelos que também incluíram interações com os outros efeitos. O

tempo de permanência no descongelador foi usado como covariável. Um modelo de regressão logística *Backward Stepwise*, especificado pela opção '*Selection=Backward*' no SAS, foi utilizado. As variáveis foram continuamente removidas dos modelos iniciais pelo critério estatístico de Wald, quando $P > 0,10$. O teste de Hosmer e Lemeshow (*Hosmer-Lemeshow-Goodness-of-Fit Test*), especificado pela opção "LACKFIT", foi utilizado para comparar o modelo final selecionado e os modelos iniciais (modelos não reduzidos). Todos os modelos finais foram adequados, apresentando $P > 0,98$. Os modelos finais consideraram apenas sequência de palheta (1 a 10), touro (1, 2 e 3) e sua interação; ou grupo de palheta (1, 2 e 3), touro (1, 2 e 3) e sua interação. Diferenças estatísticas para taxa de concepção por sequência de palheta (Palheta1-IA a Palheta10-IA) ou por grupo de palheta (Grupo1-IATF, Grupo2-IATF e Grupo3-IATF), e por touros (1, 2 e 3), foram analisadas por regressão logística utilizando os métodos dos quadrados mínimos (*Least squares means; LS Means*) do procedimento GLIMMIX. Diferença significativa foi considerada quando $P < 0,05$.

2.3.2. Análise estatística do experimento laboratorial

Como descrito anteriormente, três partidas de sêmen de cada touro foram analisadas. Assim, para cada touro, três ensaios foram considerados.

Os valores de todas as variáveis espermáticas das análises laboratoriais foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade de variância. As variáveis dependentes que não atenderam as premissas estatísticas foram submetidas à transformação arco-seno. Então, a fim de se comparar os resultados de Palheta1-Lab e Palheta10-Lab, os dados foram submetidos à análise de

variância e as diferenças entre tratamentos foram separadas utilizando o teste de Tukey. Efeitos de touro (1, 2 e 3), grupo de palheta (Palheta1-Lab e Palheta10-Lab), e interação entre touro e grupo de palheta foram avaliados.

Adicionalmente, os resultados das análises laboratoriais foram testados pelo teste t-pareado. Entretanto, para as análises do teste t-pareado, os grupos Palheta1-Lab e Palheta10-Lab foram comparados separadamente para cada touro. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão, e $P < 0,05$ foi considerado significativo.

3. Resultados e Discussão

No presente estudo observou-se que a sequência de inseminação após descongelamento simultâneo de múltiplas palhetas de sêmen pode afetar a taxa de concepção de vacas pluríparas pós-parto, dependendo de qual touro é utilizado no programa de IATF.

O sêmen de um dos três touros analisados demonstrou apresentar fertilidade diminuída para o grupo de palhetas associado com o intervalo mais longo entre o descongelamento até a IA (Grupo3-IATF). Em contrapartida, o sêmen dos outros touros não demonstrou ser estatisticamente diferente com respeito à fertilidade a campo para qualquer grupo de palheta (Grupo1-IATF, Grupo2-IATF e Grupo3-IATF), como pode ser observado na Tabela 2.

Em vacas de corte, balanço energético negativo e lactação são dois importantes fatores que afetam as taxas de ovulação e de prenhez (MENEGETTI et al., 2009). Além do ECC e da parição, a qualidade do semên e do inseminador

também são fatores extremamente importantes que podem afetar o sucesso dos programas de IATF. Adicionalmente, diferenças entre os lotes reprodutivos dentro da mesma propriedade podem ocorrer devido a interação de diversos fatores que afetam os resultados (SÁ FILHO et al., 2009). No presente experimento, porém, não se observou efeito de ECC ($P = 0,452$), lote ($P = 0,771$), inseminador ($P = 0,432$), dispositivo de P4 (primeiro ou segundo uso; $P = 0,212$) e touro ($P = 0,346$). Isso porque, muito provavelmente, as variáveis a campo foram muito bem distribuídas entre os lotes e utilizaram-se apenas dois inseminadores muito bem treinados, assim como apenas reprodutores de semelhante histórico de fertilidade. Além disso, todos os animais utilizados no presente estudo eram vacas da mesma categoria (vacas Nelore pluríparas lactantes), apresentando pequena variação de ECC (média $2,22 \pm 0,43$). Entretanto, uma importante interação entre touro e grupo de palheta ($P = 0,002$) e também efeito de grupo de palheta foram detectados ($P = 0,046$).

A taxa de concepção total das vacas inseminadas com a primeira até a décima palheta da sequência de inseminação foram: Palheta1-IA: 58,3% ($n = 96$); Palheta2-IA: 47,4% ($n = 95$); Palheta3-IA: 53,2% ($n = 94$); Palheta4-IA: 52,1% ($n = 94$); Palheta5-IA: 51,1% ($n = 94$); Palheta6-IA: 57,4% ($n = 94$); Palheta7-IA: 47,4% ($n=95$); Palheta8-IA: 50,0% ($n = 94$); Palheta9-IA: 40,4% ($n = 94$); Palheta10-IA: 43,6% ($n = 94$); ($P = 0,287$). Os resultados acima descritos encontram-se demonstrados na Figura 4.

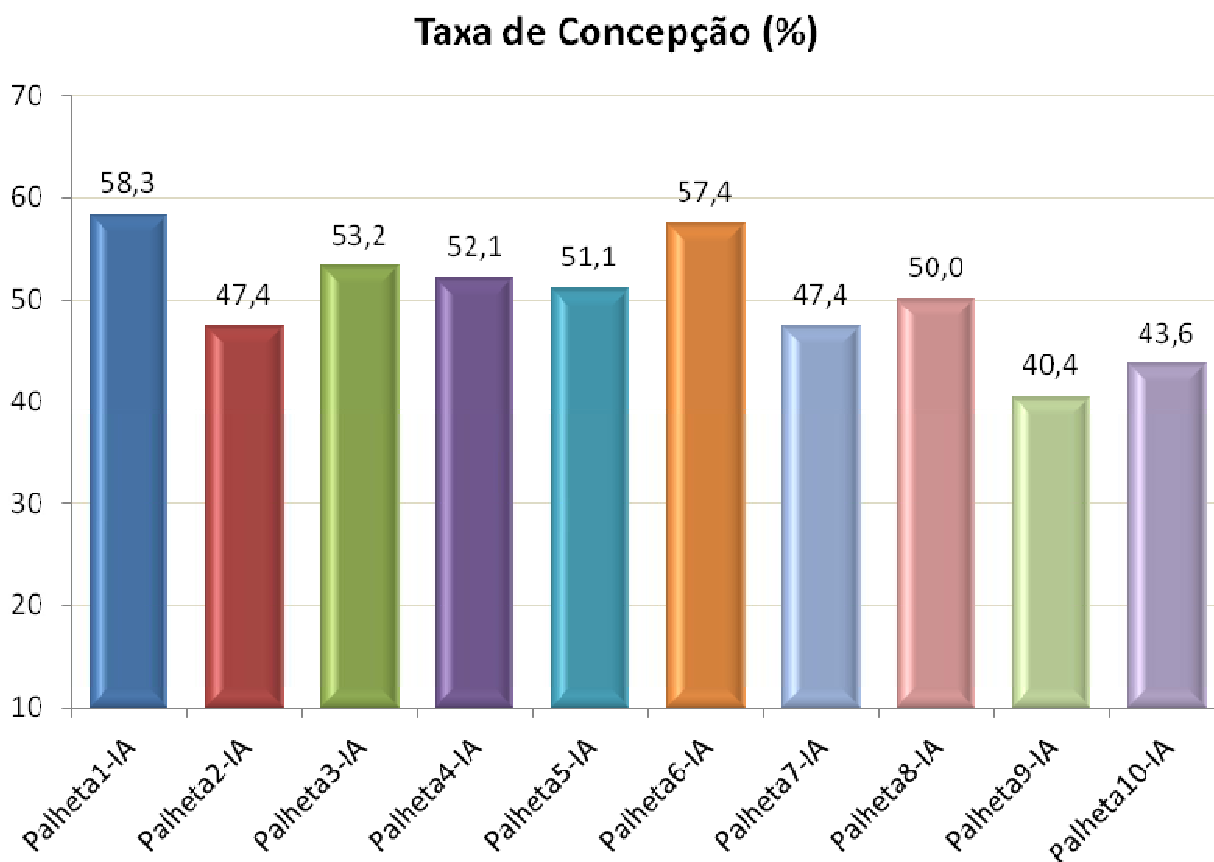


Figura 4. Taxa de concepção após IATF de vacas Nelore pós-parto, inseminadas com a primeira (Palheta1-IA) até a décima (Palheta10-IA) palheta da sequência de inseminação, após descongelamento simultâneo de dez palhetas de sêmen.

Quando os dados foram analisados por grupo de palheta, a taxa de concepção total do Grupo3-IATF foi significativamente menor do que a taxa de concepção total dos Grupo1-IATF e Grupo2-IATF. Os resultados das taxas de concepção dos três touros, obtidas no presente experimento estão apresentados na Tabela 2. Os dados descritivos de cada partida estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 2. Taxa de concepção (%; n/n) observada 40 dias após inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de vacas Nelore pluríparas lactantes.

	Grupo1-IATF	Grupo2-IATF	Grupo3-IATF	Total
Touro 1	58,1 (50/86) ^{ax}	60,2 (50/83) ^{ax}	35,3 (42/119) ^{bx}	49,3 (142/288) ^x
Touro 2	40,2 (37/92) ^{Ay}	50,5 (49/97) ^{ABx}	51,7 (62/120) ^{By}	47,9 (148/309) ^x
Touro 3	59,8 (64/107) ^{Ax}	51,0 (52/102) ^{ABx}	48,6 (67/138) ^{By}	52,7 (183/347) ^x
Total	53,0 (151/285) ^a	53,6 (151/282) ^a	45,4 (171/377) ^b	50,1 (473/944)

Grupo1-IATF: vacas inseminadas com a 1^a, 2^a ou 3^a palheta retirada do descongelador (Palheta1-IA, Palheta2-IA, Palheta3-IA); Grupo2-IATF: vacas inseminadas com a 4^a, 5^a ou 6^a palheta retirada do descongelador (Palheta4-IA, Palheta5-IA e Palheta6-IA); Grupo3-IATF: vacas inseminadas com a 7^a, 8^a, 9^a ou 10^a palheta retirada do descongelador (Palheta7-IA, Palheta8-IA, Palheta9-IA e Palheta10-IA); ^{a,b}: letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam P < 0,05; ^{A,B}: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam P < 0,10; ^{x,y}: letras diferentes na mesma coluna indicam P < 0,05.

Tabela 3. Dados descritivos da taxa de concepção (%; n/n) observada 40 dias após inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de vacas Nelore pluríparas lactantes, separada por partida.

		Grupo1-IATF	Grupo2-IATF	Grupo3-IATF
Touro 1	Partida 1	53,33 (16/30)	62,07 (18/29)	38,46 (15/39)
	Partida 2	66,67 (20/30)	70,00 (21/30)	34,09 (15/43)
	Partida 3	51,85 (14/27)	45,83 (11/24)	33,33 (12/36)
Touro 2	Partida 1	38,71 (12/31)	51,61 (16/31)	62,16 (23/37)
	Partida 2	45,16 (14/31)	51,43 (18/35)	48,89 (22/45)
	Partida 3	36,67 (11/30)	45,45 (15/33)	44,74 (17/38)
Touro 3	Partida 1	65,12 (28/43)	62,22 (28/45)	50,00 (31/60)
	Partida 2	39,29 (11/28)	50,00 (15/30)	50,00 (20/40)
	Partida 3	69,44 (25/36)	33,33 (9/27)	44,44 (16/36)

Grupo1-IATF: vacas inseminadas com a 1^a, 2^a ou 3^a palheta retirada do descongelador (Palheta1-IA, Palheta2-IA, Palheta3-IA); Grupo2-IATF: vacas inseminadas com a 4^a, 5^a ou 6^a palheta retirada do descongelador (Palheta4-IA, Palheta5-IA e Palheta6-IA); Grupo3-IATF: vacas inseminadas com a 7^a, 8^a, 9^a ou 10^a palheta retirada do descongelador (Palheta7-IA, Palheta8-IA, Palheta9-IA e Palheta10-IA); Na análise estatística, não foi observado efeito de partida.

Ressalva-se porém, que alguns aspectos importantes devem ser considerados quando se analisa os efeitos de grupo de palheta do experimento a campo. Visto que interação significativa entre touro e grupo de palheta foi detectada, é importante atentar-se para o fato de que o efeito de grupo de palheta na taxa de concepção ocorreu, em grande parte, devido ao Touro 1 (Tabela 2).

Quando a taxa de concepção apenas de vacas inseminadas com as primeiras e décimas palhetas da sequência foram analisadas, novamente, o importante efeito observado sobre a taxa de concepção foi o efeito de interação entre touro e palheta ($P = 0,0007$). A taxa de concepção total das vacas inseminadas com a primeira palheta da sequência (Palheta1-IA) foi 58% e a taxa de concepção total das vacas inseminadas com a décima palheta da sequência (Palheta10-IA) foi 44% ($P = 0,092$).

A Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA) recomenda o procedimento de descongelamento de uma única palheta de 0,5 mL de sêmen em banho-maria à temperatura de 35 a 37°C durante 30 segundos, para bovinos. Este é, em geral, o período mínimo de descongelamento utilizado como rotina nas fazendas brasileiras. No presente estudo, um grupo de 10 palhetas foi utilizado pois estimou-se ser este o número máximo de palhetas que é descongelado simultaneamente na prática brasileira, em IATFs de grandes rebanhos.

Como anteriormente mencionado, a sequência da inseminação foi exatamente a mesma sequência que a remoção das palhetas do descongelador. Assim, para cada vaca, o intervalo entre a remoção da palheta do descongelador, preparo do aplicador e deposição do sêmen no trato reprodutivo da fêmea, foram intimamente relacionados e com pouca variação. Em média, o intervalo entre a

remoção da palheta do descongelador até IA, para cada palheta na sequência, foi de aproximadamente 40 segundos.

Incluindo-se os 30 segundos adicionais referentes ao tempo mínimo de descongelamento simultâneo das dez palhetas, o intervalo de tempo entre imergir o grupo de dez palhetas dentro do descongelador até a IA da terceira vaca na sequência (Grupo1-IATF) foi aproximadamente 120 segundos (Touro 1: 120 ± 42 seg; Touro 2: 119 ± 47 seg; Touro 3: 123 ± 48 seg). O intervalo de tempo entre imergir o grupo de dez palhetas dentro do descongelador até a IA da sexta vaca na sequência (Grupo2-IATF) foi aproximadamente 260 segundos (Touro 1: 270 ± 69 seg; Touro 2: 253 ± 64 seg; Touro 3: 247 ± 57 seg). O intervalo de tempo entre imergir o grupo de dez palhetas dentro do descongelador até a IA da décima vaca na sequência (Grupo3-IATF) foi aproximadamente 420 segundos (Touro 1: 412 ± 91 seg; Touro 2: 430 ± 114 seg; Touro 3: 412 ± 87 seg), como pode ser observado na Tabela 4.

Assim, com um intervalo de tempo tão curto entre a remoção da palheta do descongelador até a inseminação do animal, é intrigante como a diferença de apenas alguns minutos de incubação poderia ter interferido na taxa de concepção de vacas inseminadas com o Grupo3-IATF, quando comparadas com o Grupo1-IATF e Grupo2-IATF; mesmo considerando-se que este efeito significativo foi observado em apenas um touro específico.

Tabela 4. Média (\pm desvio padrão) do intervalo de tempo entre a inserção das dez palhetas de sêmen no descongelador até o momento da IA, para cada Grupo de palheta (Grupo1-IATF, Grupo2-IATF e Grupo3-IATF), incluindo o tempo mínimo de descongelamento de 30 segundos.

	Grupo1-IATF	Grupo2-IATF	Grupo3-IATF
Touro 1	120 \pm 42	270 \pm 69	412 \pm 91
Touro 2	119 \pm 47	253 \pm 64	430 \pm 114
Touro 3	123 \pm 48	247 \pm 57	412 \pm 87
Média Total	121 \pm 46	257 \pm 63	418 \pm 96
Varição (mín – max)	30 – 240 seg	120 – 390 seg	210 – 660

Grupo1-IATF: vacas inseminadas com a primeira, segunda ou terceira palheta retirada do descongelador (Palheta1-IA, Palheta2-IA, Palheta3-IA); Grupo2-IATF: vacas inseminadas com a quarta, quinta ou sexta palheta retirada do descongelador (Palheta4-IA, Palheta5-IA e Palheta6-IA); Grupo3-IATF: vacas inseminadas com a sétima, oitava, nona ou décima palheta retirada do descongelador (Palheta7-IA, Palheta8-IA, Palheta9-IA e Palheta10-IA).

Em geral, as recomendações padrão para descongelamento de sêmen bovino criopreservado consiste em não descongelar mais palhetas de sêmen do que se pode ser depositado na fêmea dentro de 10 a 15 minutos, mantendo sempre a homeostase térmica durante este intervalo (DeJARNETTE et al., 2002; 2004). GOODELL (2000), em um estudo com apenas 180 inseminações, relatou diminuição nas taxas de concepção com a inseminação das terceira e quarta palhetas, quando mais de duas palhetas foram descongeladas simultaneamente. Entretanto, DeJARNETTE et al. (2002) revisou os efeitos da sequência de inseminação após descongelamento simultâneo sobre as taxas de concepção com dados coletados de diversos estudos (n = 19.000 inseminações). Os autores demonstraram que até quatro palhetas de sêmen podem ser descongeladas simultaneamente, sem prejuízos para a fertilidade, desde que os inseminadores sigam rigorosamente os procedimentos corretos de manipulação do sêmen e

respeitem o período limite de 15 a 20 minutos entre descongelamento do sêmen e inseminação. Da mesma forma, KAPROTH et al. (2002) e DALTON et al. (2004) demonstraram que inseminadores experientes podem descongelar várias palhetas de sêmen de 0,5 mL simultaneamente e inseminar até quatro vacas dentro de um intervalo de 20 minutos, sem comprometer a fertilidade a campo do sêmen.

Em um estudo semelhante ao presente experimento, SPRENGER et al. (2001) observaram que uma interação entre rebanho e sequência de inseminação tendeu a influenciar os resultados de fertilidade a campo. De acordo com os autores, em determinado rebanho, as palhetas número 5 apresentaram taxa de concepção reduzida em relação as outras palhetas da sequência (1 até 7). Em outro rebanho, a taxa de concepção das palhetas número 6 e 7 foram inferiores que a taxa de concepção das palhetas 1 a 5. No entanto, nos outros onze rebanhos avaliados por SPRENGER et al. (2001), a sequência de inseminação não teve nenhum efeito sobre a taxa de concepção. Os autores concluíram que, garantindo-se que os procedimentos recomendados de manuseio do sêmen sejam seguidos, pode-se descongelar mais que duas palhetas de uma só vez sem comprometer a fertilidade do sêmen.

Embora no presente experimento o grupo a ser descongelado simultaneamente continha dez palhetas, a média do intervalo máximo (389 ± 97 seg), assim como o maior intervalo absoluto (630 seg), entre o descongelamento até a IA foram evidentemente menores do que o intervalo limite dos estudos acima relatados (onde as inseminações foram completadas até 20 minutos após descongelamento). Assim, a hipótese que outro fator adicional ao tempo de

incubação poderia ter influenciado a redução da fertilidade para Grupo3-IATF, não deve ser descartada.

Uma importante consideração a ser feita é a possibilidade de alguma influência da temperatura ambiente. De acordo com SHEPARD (citado por DeJARNETTE et al., 2002), altas temperaturas ambientais podem ser problemáticas para a manutenção da fertilidade pós-descongelamento. Os autores observaram interação da temperatura do ambiente com o intervalo até a deposição do sêmen, devido ao tempo prolongado no banho-maria (> 10 min), quando as temperaturas ambientes ficam acima de 17°C.

Neste sentido, os resultados de LEE et al. (1997) também sugeriram que maiores sequências de inseminação podem comprometer as taxas de concepção, quando associadas aos efeitos de elevada temperatura ambiental e/ou exposição à luz solar. Portanto, levando em consideração que o presente estudo aconteceu durante o período de verão de uma região tropical, a alta temperatura ambiente (por volta de 30°C) durante o período experimental pode ter interferido (e/ou potencializado) nos efeitos do tempo de incubação da sequência de inseminação. Assim sendo, mesmo considerando que a redução na taxa de concepção associada com o maior intervalo até a deposição do sêmen (Grupo3-IATF) foi devido principalmente a um único touro, pode-se especular que a elevada temperatura ambiente pode ter interagido com os efeitos do tempo de incubação. Neste caso, sob estas condições, de alguma forma a fertilidade do sêmen deste touro específico (Touro 1) foi mais suscetível aos efeitos da sequência de inseminação do que o sêmen dos outros dois touros avaliados.

Neste experimento, a variação de temperatura no banho-maria foi um fator considerado. Assim, em simulação laboratorial, a temperatura da água foi medida durante o período de incubação em que as palhetas permaneceram no descongelador. No entanto, nenhuma variação marcante de temperatura foi observada durante o período de incubação simulado em laboratório, como pode ser observado na Figura 5.

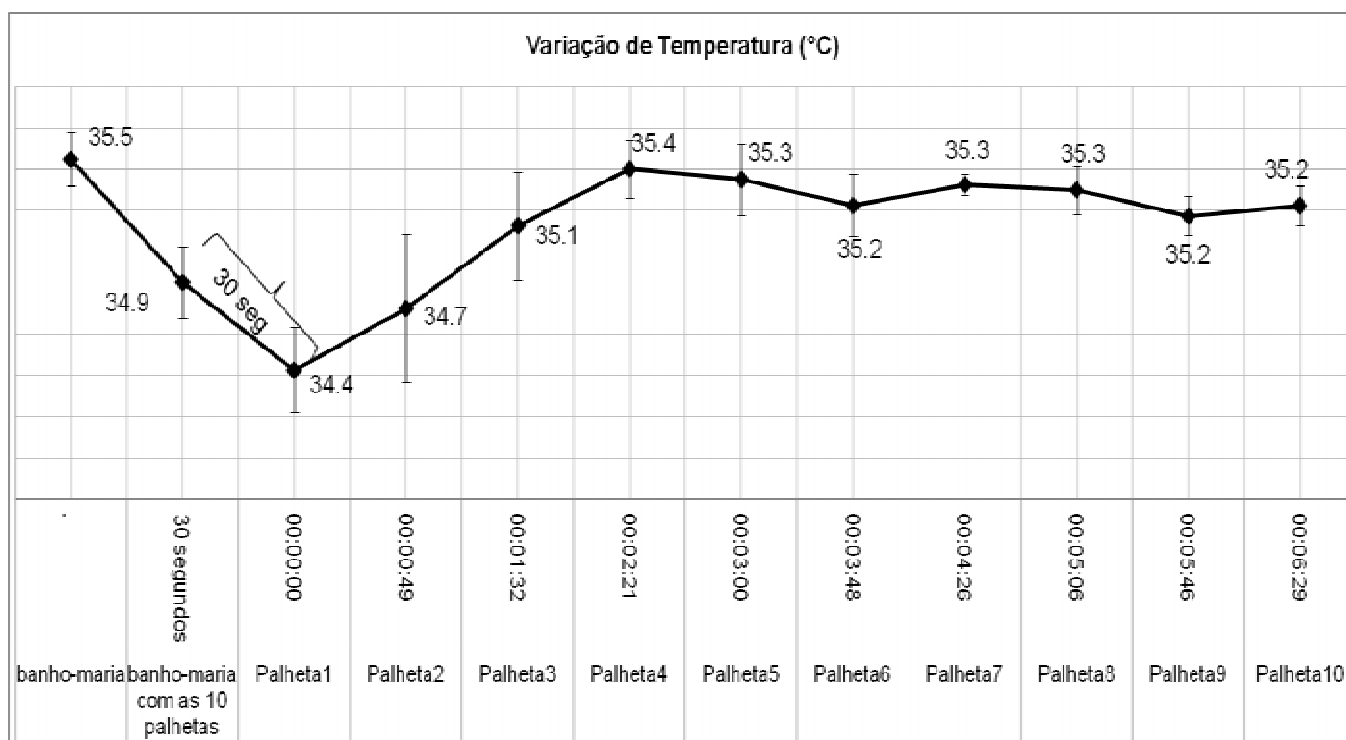


Figura 5. Variação da temperatura do banho-maria termostaticamente controlado (400 mL) durante o descongelamento simultâneo de dez palhetas de 0.5 mL de sêmen. Os pontos do eixo horizontal referem-se ao tempo médio que cada palheta permaneceu no descongelador, de acordo com os dados do experimento a campo. Em laboratório, o ambiente de descongelamento foi simulado e a temperatura avaliada por termômetro digital em cada um dos tempos descritos na figura.

Entretanto, vale ressaltar que a temperatura ambiente regular durante a simulação em laboratório (em torno de 20 °C) pode não representar a real temperatura ambiente do experimento a campo. Portanto, talvez a variação de temperatura no descongelador durante o experimento a campo tenha sido diferente da variação de temperatura do descongelador durante o experimento laboratorial.

Após análise de variância das características espermáticas, não foi observado efeito de touro, grupo de palheta ou interação entre touro e grupo de palheta para as seguintes variáveis: TM, TM após 2h, PM, PM após 2h, VAP, VAP após 2h, VSL, VSL após 2h, VCL, VCL após 2h, ALH, ALH após 2h, BCF, BCF após 2h, STR, STR após 2h, LIN, LIN após 2h, RAPID, RAPID após 2h, AIML, ALML, AIMI, ALMI, MINP, MIP, Dif, CV, área, perímetro, largura e comprimento ($P > 0,05$). A variável L/C (razão largura:comprimento) da análise morfométrica foi a única característica espermática que demonstrou interação significativa entre touro e grupo de palheta ($P = 0,024$). Nesta característica espermática em particular, um efeito significativo de touro também foi observado ($P < 0,001$), embora efeito de grupo de palheta não tenha sido observado ($P = 0,223$).

Com o intuito de investigar e/ou entender melhor os resultados laboratoriais, o teste t-pareado foi também realizado. Visto que no experimento a campo o principal efeito observado foi a interação entre touro e grupo de palheta, considerou-se que as variáveis espermáticas (Palheta1-Lab vs. Palheta10-Lab) deveriam ser também analisadas separadamente por touro pelo teste t-pareado.

Assim sendo, como pode ser observado nas Tabelas 5 e 6, intrigantemente, efeito de palheta foi observado nas variáveis PM ($P = 0,044$), ALH ($P = 0,014$), RAPID ($P = 0,047$), ALML ($P = 0,042$) e MINP ($P = 0,043$), apenas para o Touro 2.

BROWN et al. (1991) demonstraram que até 10 palhetas de 0,5 mL podem ser descongeladas simultaneamente a 36°C sem comprometer a qualidade do sêmen. Os autores observaram que o número de palhetas não teve efeito sobre a porcentagem de espermatozoides móveis na avaliação por microscopia óptica, realizadas na hora zero (BROWN et al., 1991). No entanto, na análise pelo CASA avaliado a 0-h do presente experimento, efeito significativo sobre a motilidade espermática foi observado no grupo Palheta10-Lab em comparação ao grupo Palheta1-Lab, mas apenas no Touro 2 (Tabela 5).

Por outro lado, para o Touro 1, que foi o único touro significativamente afetado pela sequência de inseminação na fertilidade a campo, foi observada tendência para efeito de palheta ($P = 0,591$), mas apenas na variável L/C da análise morfométrica (Tabela 6).

Vale ressaltar que, no presente estudo, a incubação de 20 minutos com o corante Hoechst (H342) se fez necessário para o preparo das amostras antes da avaliação pelo CASA. Ressalva-se, portanto, que os parâmetros de motilidade não são os valores reais do sêmen utilizado no presente experimento. No entanto, uma vez que todas as amostras seminais foram submetidas ao mesmo procedimento de coloração pelo H342, são as diferenças entre os valores da Palheta1-Lab e Palheta10-Lab que devem ser considerados, ao invés dos valores absolutos obtidos.

Tabela 5. Média (\pm desvio padrão) das características espermáticas *in vitro* do sêmen dos grupos Palheta1-Lab (grupo das palhetas removidas do descongelador após 30 segundos) e Palheta10-Lab (grupo das palhetas removidas do descongelador 6 minutos e 29 segundos após Palheta1-Lab), avaliadas pela análise computadorizada do sêmen (CASA) após 0 e 2 h de incubação térmica a 37°C

	Touro 1		Touro 2		Touro 3	
	Palheta1-Lab	Palheta10-Lab	Palheta1-Lab	Palheta10-Lab	Palheta1-Lab	Palheta10-Lab
TM (%)	51,0 \pm 4,2	38,0 \pm 7,1	33,6 \pm 8,9	25,2 \pm 8,2	46,1 \pm 15,9	41,1 \pm 17,7
PM (%)	44,3 \pm 4,3	29,5 \pm 9,8	28,0 \pm 7,2 ^a	21,5 \pm 6,4 ^b	32,0 \pm 9,7	28,6 \pm 11,4
VAP (μm/s)	66,5 \pm 7,5	59,0 \pm 7,9	64,2 \pm 5,5	62,2 \pm 4,4	56,5 \pm 2,1	56,6 \pm 5,1
VSL (μm/s)	60,2 \pm 7,7	53,2 \pm 8,0	56,9 \pm 3,6	56,2 \pm 4,0	48,4 \pm 4,0	48,8 \pm 3,9
VCL (μm/s)	93,3 \pm 7,1	85,6 \pm 11,8	95,3 \pm 8,0	91,2 \pm 5,7	86,7 \pm 5,2	88,1 \pm 10,5
ALH (μm)	3,9 \pm 0,1	4,0 \pm 0,3	4,2 \pm 0,2 ^a	4,0 \pm 0,3 ^b	4,5 \pm 0,9	4,4 \pm 0,5
BCF (Hz)	23,7 \pm 2,7	26,4 \pm 3,4	25,7 \pm 3,7	24,1 \pm 3,8	24,6 \pm 5,3	25,1 \pm 3,7
STR (%)	90,6 \pm 1,4	90,3 \pm 2,8	89,2 \pm 2,1	90,8 \pm 0,4	86,3 \pm 5,3	86,8 \pm 3,2
LIN (%)	67,1 \pm 3,3	65,2 \pm 4,7	62,9 \pm 2,5	64,6 \pm 1,0	58,6 \pm 8,1	58,5 \pm 5,5
RAPID (%)	46,0 \pm 4,4	30,6 \pm 10,0	29,3 \pm 7,2 ^a	22,0 \pm 6,6 ^b	35,4 \pm 12,2	31,1 \pm 13,0
TM_2h (%)	19,8 \pm 10,7	12,7 \pm 7,7	6,8 \pm 3,1	5,4 \pm 4,7	25,7 \pm 15,2	23,0 \pm 21,3
PM_2h (%)	16,0 \pm 9,9	8,9 \pm 7,5	4,6 \pm 2,3	3,5 \pm 2,9	15,8 \pm 6,9	13,3 \pm 11,9
VAP_2h (μm/s)	57,9 \pm 4,4	50,9 \pm 8,1	49,0 \pm 4,8	50,0 \pm 5,7	55,5 \pm 8,5	52,4 \pm 3,5
VSL_2h (μm/s)	50,4 \pm 5,3	44,7 \pm 7,1	41,2 \pm 3,5	42,7 \pm 5,1	46,0 \pm 7,0	43,1 \pm 2,8
VCL_2h(μm/s)	90,0 \pm 3,4	78,3 \pm 12,2	82,3 \pm 12,3	81,8 \pm 6,8	92,5 \pm 14,6	87,0 \pm 9,5
ALH_2h (μm)	4,3 \pm 0,2	3,7 \pm 0,5	4,3 \pm 0,5	3,8 \pm 0,9	4,9 \pm 0,4	4,3 \pm 0,8
BCF_2h (Hz)	24,0 \pm 0,9	21,7 \pm 6,0	18,6 \pm 8,1	22,8 \pm 3,8	24,7 \pm 1,5	24,8 \pm 2,8
STR_2h (%)	88,0 \pm 1,8	88,3 \pm 1,1	84,4 \pm 1,1	86,2 \pm 0,8	84,1 \pm 1,2	83,2 \pm 1,2
LIN_2h (%)	60,6 \pm 5,3	60,3 \pm 4,7	53,4 \pm 3,8	55,2 \pm 3,3	52,8 \pm 0,3	52,8 \pm 1,6
RAPID_2h (%)	16,9 \pm 9,9	9,4 \pm 8,1	5,0 \pm 2,7	3,7 \pm 3,2	17,5 \pm 8,4	15,2 \pm 13,5

TM: Motilidade Total; PM: Motilidade Progressiva; VAP: Velocidade de trajeto; VSL: Velocidade retilínea; VCL: Velocidade curvilínea; ALH: Amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF: Frequência de batimento; STR: Retilinearidade; LIN: Linearidade; RAPID: porcentagem de células rápidas; TM_2h: Motilidade Total após 2h; PM_2h: Motilidade Progressiva após 2h; VAP_2h: Velocidade de trajeto após 2h; VSL_2h: Velocidade retilínea após 2h; VCL_2h: Velocidade curvilínea após 2h; ALH_2h: Amplitude do deslocamento lateral da cabeça após 2h; BCF_2h: Frequência de batimento após 2h; STR_2h: Retilinearidade após 2h; LIN_2h: Linearidade após 2h; RAPID_2h: células rápidas após 2h; ^{a,b}: letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam P < 0,05.

Tabela 6. Média (\pm desvio padrão) das características espermáticas *in vitro* do sêmen dos grupos Palheta1-Lab (grupo das palhetas removidas do descongelador após 30 segundos) e Palheta10-Lab (grupo das palhetas removidas do descongelador 6 minutos e 29 segundos após Palheta1-Lab) avaliadas pelas análises de integridade de membranas plasmática e acrossomal, peroxidação lipídica, morfometria espermática e compactação cromatínica

	Touro 1		Touro 2		Touro 3	
	Palheta1-Lab	Palheta10-Lab	Palheta1-Lab	Palheta10-Lab	Palheta1-Lab	Palheta10-Lab
AIMI (%)	39,1 \pm 6,6	38,1 \pm 7,6	36,5 \pm 5,6	33,7 \pm 6,6	47,2 \pm 14,8	42,1 \pm 11,2
AIML (%)	29,8 \pm 8,0	27,6 \pm 11,1	32,9 \pm 4,5	28,3 \pm 5,2	32,1 \pm 2,1	35,4 \pm 4,3
ALMI (%)	0,4 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1
ALML (%)	30,8 \pm 10,4	34,2 \pm 14,2	30,3 \pm 8,7 ^a	37,8 \pm 11,4 ^b	20,5 \pm 16,3	22,3 \pm 15,4
MIP (%)	0,5 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1	2,1 \pm 1,8	0,6 \pm 0,2	0,5 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2
MINP (%)	30,9 \pm 3,5	29,4 \pm 7,2	30,3 \pm 5,1 ^a	24,9 \pm 4,7 ^b	40,8 \pm 16,3	37,5 \pm 18,3
MLP (%)	1,4 \pm 0,7	0,7 \pm 0,2	3,8 \pm 2,3	1,7 \pm 0,4	2,0 \pm 1,4	0,9 \pm 0,5
MLNP (%)	67,2 \pm 4,3	69,5 \pm 7,1	63,8 \pm 4,4	72,9 \pm 4,3	61,2 \pm 18,9	56,7 \pm 17,0
L/C	0,518 \pm 0,002 ^A	0,525 \pm 0,005 ^B	0,532 \pm 0,004	0,544 \pm 0,004	0,522 \pm 0,010	0,514 \pm 0,005
A (pixel)	5308,7 \pm 348,6	5402,8 \pm 559,0	5253,3 \pm 135,0	5330,2 \pm 149,7	5302,3 \pm 193,6	5404,7 \pm 112,9
P (pixel)	23,9 \pm 0,8	24,0 \pm 1,2	23,6 \pm 0,3	23,7 \pm 0,3	23,8 \pm 0,4	24,1 \pm 0,3
L (pixel)	4,6 \pm 0,2	4,7 \pm 0,3	4,7 \pm 0,1	4,8 \pm 0,1	4,7 \pm 0,1	4,7 \pm 0,1
C (pixel)	9,0 \pm 0,3	9,0 \pm 0,5	8,8 \pm 0,1	8,8 \pm 0,1	8,9 \pm 0,1	9,1 \pm 0,1
Dif (%)	4,6 \pm 0,9	7,6 \pm 3,7	7,1 \pm 1,6	8,7 \pm 4,3	8,7 \pm 6,7	5,8 \pm 1,7
CV (%)	8,1 \pm 3,7	8,6 \pm 3,7	10,6 \pm 0,4	11,1 \pm 1,7	8,5 \pm 2,5	8,3 \pm 1,6

AIMI: células com membranas plasmática e acrossomal intactas; ALMI: células com membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada; AIML: células com membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra; ALML: células com membranas plasmática e acrossomal lesionadas; MINP: células com membrana plasmática íntegra e reduzida peroxidação lipídica; MIP: células com membrana plasmática íntegra e elevada peroxidação lipídica; L/C: razão largura:comprimento; A: área; P: perímetro; L: largura; C: comprimento; Dif%: Porcentagem de espermatozoides com cromatina descompactada na amostra; CV: Coeficiente de variação dos graus de cinza, o qual representa a heterogeneidade cromatínica; ^{a,b}: letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam $P < 0,05$; ^{A,B}: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam $P < 0,06$.

Em relação as análises do CASA realizadas após 2 horas de incubação térmica, nenhum efeito de palheta foi observado, para nenhum touro avaliado. Esta análise laboratorial teve como objetivo detectar diferenças na resistência térmica entre Palheta1-Lab e Palheta10-Lab, o que poderia explicar uma possível

diferença na capacidade de sobrevivência dos espermatozoides após a inseminação com palhetas do Grupo1-IATF ou Grupo3-IATF. Porém, a suposição de que o ambiente térmico do descongelamento poderia ter interferido, de alguma forma, na longevidade espermática de sêmen mais sensíveis (como supostamente ocorreu para o Touro 1 no experimento a campo), não pôde ser confirmada pela presente análise laboratorial (Tabela 5).

Adicionalmente, esperava-se que diferenças na integridade das membranas plasmática e acrossomal entre Palheta1-Lab e Palheta10-Lab fossem observadas, principalmente para o Touro 1. Entretanto, uma maior ($P < 0.05$) porcentagem de células ALML (espermatozoides apresentando membranas plasmática e acrossomal lesionadas) no grupo Palheta10-Lab, comparado ao grupo Palheta1-Lab, foi observada apenas para o Touro 2 (Tabela 6).

Outro fator avaliado no presente estudo foi a ocorrência de estresse oxidativo devido ao ambiente térmico do descongelamento simultâneo de diversas palhetas seminais. Espermatozoides são muito susceptíveis a oxidação das membranas plasmáticas devido a presença de ácidos graxos polinsaturados (AITKEN & FISHER, 1994). A intensa produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) pode, eventualmente, inibir o movimento espermático. Quando as concentrações de EROS tornam-se suficientemente elevadas para saturar e/ou superar os mecanismos de defesa natural da célula (e/ou dos meios diluidores), estas podem causar danos às proteínas, ácidos nucleicos, e lipídeos de membrana (STOREY, 1997). No presente estudo, além da diminuição da Motilidade Progressiva e de RAPID, e do aumento de células ALML, uma diminuição significativa no percentual de células MINP (espermatozoides com

membrana plasmática intacta sem peroxidação lipídica) foi também observada na palheta10-lab, do Touro 2 (Tabela 6). Este resultado é interessante do ponto de vista que esses danos espermáticos parecem estar associados. Entretanto, a especulação de que a redução na fertilidade a campo do Grupo3-IATF para o Touro 1 poderia ser devido ao estresse oxidativo causado pelo ambiente térmico do descongelador, não foi confirmada no laboratório. Adverte-se, entretanto, que efeitos negativos de alguns sistemas geradores de EROS não necessitam da ocorrência de peroxidação lipídica para induzir mudanças citotóxicas no espermatozoide (GUTHRIE & WELCH, 2007). Neste sentido, GUTHRIE & WELCH (2007) observaram que Menadiona e H_2O_2 reduzem a porcentagem de espermatozoides móveis, mas não têm efeito sobre a oxidação da sonda BODIPY.

KASIMANICKAM et al. (2007) observou que touros com maior peroxidação lipídica de espermatozoides são mais propensos a ter elevado índice de fragmentação de DNA e membrana plasmática lesionada. Contudo, no presente estudo, nenhuma observação importante em relação à compactação ou heterogeneidade cromatínica foi detectada comparando-se os grupos Palheta1-Lab e Palheta10-Lab, para nenhum touro avaliado.

Em contrapartida, os resultados da variável L/C da morfometria espermática parecem indicar alguma relação com os resultados obtidos a campo. A análise de variância demonstrou interação ($P < 0,05$) de touro e grupo de palheta para esta característica espermática. Da mesma forma, a tendência ($P < 0,06$) observada no teste t-pareado (Tabela 6), parece indicar que o índice L/C foi diferente entre Palheta1-Lab e Palheta10-Lab, apenas no Touro 1 (Tabela 2).

De acordo com BELETTI et al. (2005a), a variável L/C da análise morfométrica apresenta uma correlação inversa com a elipticidade espermática. Quando L/C aumenta, a cabeça espermática tende a ser mais esférica (BELETTI et al., 2005a; 2005b). Portanto, como observado na Tabela 6, as cabeças espermáticas do Touro 1 foram detectadas serem menos elípticas (mais esféricas) no grupo Palheta10-Lab que no grupo Palheta1-Lab.

Em um interessante estudo, OSTERMEIER et al. (2001) demonstrou que a forma média de espermatozoides identificados como sendo de touros de alta fertilidade foi mais afilada e alongada do que a forma média de espermatozoides oriundos de touros de baixa fertilidade dentre os touros avaliados. Apesar disso, pequenas variações no tamanho ou na forma da cabeça do espermatozoide podem existir sem alterar a simetria lateral e/ou as propriedades hidrodinâmicas da célula, não interferindo com a capacidade de fertilização dos espermatozoides (BELETTI et al., 2005a).

Tomados em conjunto, só pode ser especulado que o aumento de L/C da Palheta10-Lab comparado a Palheta1-Lab pode indicar que o tempo de incubação durante o experimento laboratorial pode ter interferido na elipticidade das cabeças espermáticas do Touro 1. Visto que nenhuma alteração adicional no formato dos espermatozoides ou nas características cromatínicas, ou ainda nenhuma ocorrência significativa de danos espermáticos foi observado para o grupo Palheta10-Lab do Touro 1, é difícil sugerir e/ou especular possíveis causas para tais alterações de elipticidade. Ainda assim, a relevância biológica deste achado em particular, assim como sua correlação com os efeitos observados na fertilidade do sêmen, incentiva investigações mais aprofundadas.

Apesar de alguns resultados interessantes a respeito de características espermáticas *in vitro*, uma consideração notável, que também foi confirmada no presente estudo, é a importância de experimentos a campo para conclusões definitivas em relação à fertilidade do sêmen. Assim, considerando que a alta temperatura ambiente durante experimento de campo pode ter potencializado os efeitos do tempo de incubação sobre a qualidade do sêmen, a suposição de que o ambiente térmico do descongelador poderia ter interferido a longevidade e/ou a fertilidade dos espermatozoides do touro 1, não deve ser descartada.

Finalmente, referente à importante interação entre touro e grupo de palheta observada no experimento a campo, destaca-se novamente que a fertilidade do sêmen de alguns touros parece ser mais negativamente afetada pela permanência das palhetas no descongelador que de outros. Infelizmente, as análises seminais realizadas *in vitro* não foram capazes de esclarecer o efeito da interação entre touro e grupo de palheta observado na fertilidade *in vivo*. Ou porque o número de reprodutores utilizados foi muito pequeno, ou o experimento laboratorial não foi capaz de simular corretamente o ambiente de descongelamento do experimento a campo, ou os fatores testados laboratorialmente não foram pertinentes para avaliar as alterações na qualidade do sêmen deste estudo. De qualquer maneira, a razão pela qual o sêmen de alguns touros parece ser mais suscetível e/ou diferentemente afetado por específicos procedimentos, e/ou ambientes de descongelamento, permanece para ser futuramente investigado.

4. Conclusão

A sequência de inseminação após descongelamento simultâneo de diversas palhetas de sêmen pode afetar a fertilidade seminal, dependendo do reprodutor selecionado para o programa reprodutivo. Assim, nas condições a campo do presente experimento, dez palhetas de 0,5 mL de sêmen não devem ser descongeladas simultaneamente, uma vez que pode vir a afetar as taxas de concepção, de acordo com o sêmen utilizado. Portanto, em procedimentos semelhantes de programas de IATF de grandes rebanhos, parece mais cauteloso não exceder o número de seis palhetas de 0,5 mL de sêmen para descongelamento simultâneo. No entanto, os efeitos desse ambiente de descongelamento sobre as características espermáticas *in vitro*, que poderia explicar a diminuição da fertilidade *in vivo* do sêmen, não pôde ser elucidado.

III. CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE A CAMPO E DE DIVERSAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS IN VITRO DO SÊMEN DE DIFERENTES TOUROS ANGUS UTILIZADOS EM UM MESMO PROGRAMA DE IATF DE VACAS NELORES PÓS-PARTO*

***Capítulo baseado no artigo científico publicado no periódico “Livestock Science” (DOI: 10.1016/j.livsci.2012.02.018)**

Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar a taxa de concepção, bem como diversas características espermáticas do sêmen de diferentes touros utilizados em um mesmo programa de IATF. Vacas Nelore pós-parto (n = 947), distribuídas em oito lotes de aproximadamente 120 animais, foram submetidas ao mesmo protocolo de IATF. Doses de sêmen congelado de três touros Angus, sendo três partidas diferentes de cada touro, e cerca de 100 doses de cada partida foram utilizadas. Touro, partida e inseminadores foram igualmente distribuídos entre os lotes. O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após IATF. Para as análises seminais, o mesmo procedimento de descongelamento foi repetido no laboratório para simular as condições de descongelamento a campo. As seguintes análises espermáticas foram realizadas: análise computadorizada da motilidade, avaliação da termo-resistência espermática após 2 horas de incubação, integridade da

membrana plasmática e acrossomal, peroxidação lipídica, morfologia, morfometria e estrutura cromatínica. Na análise a campo, não houve efeito de lote, condição corporal, inseminador e touro ($P > 0,05$). No entanto, algumas diferenças significativas entre touros foram detectadas nas análises laboratoriais. O sêmen do touro que apresentou taxa de concepção numericamente inferior ($P > 0,05$) apresentou menor ($P < 0,05$) motilidade total após 2 horas de incubação térmica, menor ($P < 0,06$) motilidade progressiva e porcentagem de células rápidas após 2 horas de incubação térmica, maior ($P < 0,05$) porcentagem de defeitos maiores e totais, menor ($P < 0,05$) comprimento, elipticidade, e índice Fourier_0 na análise morfométrica, bem como maior ($P < 0,05$) heterogeneidade cromatínica. Concluiu-se que, embora não tenha sido observado efeito de touro no experimento de campo, o reprodutor que apresentou taxa de concepção numericamente inferior, também apresentou pior qualidade seminal de acordo com as análises laboratoriais realizadas.

Palavras-chave: características espermáticas, fertilidade, taxa de concepção.

ABSTRACT

In order to provide information that may help researchers to understand the main(s) cause(s) of differences in bull fertility frequently observed in field trials, this study aimed to investigate conception rates as well as several *in vitro* sperm characteristics of different sires of unknown fertility utilized in a Timed-AI (TAI) program. Suckled Nelore cows ($n = 947$) submitted to the same TAI protocol were allocated into eight breeding groups of approximately 120 animals each. Frozen

sêmen doses from three Angus bulls and three different batches from each bull were utilized. Approximately 100 doses from each batch were used in TAI. Sires, batches and AI technicians were equally distributed across breeding groups. Cows were examined for pregnancy diagnosis 40 days after TAI. For *in vitro* sperm analyses, the same thawing procedure was repeated in the laboratory to mimic field conditions. The following *in vitro* sperm characteristics were assessed: computer assisted semen analysis, sperm thermal resistance after 2 hours incubation, plasma and acrosomal membrane integrity, lipid peroxidation, morphology, morphometry and chromatin structure. No effect of breeding group, body condition score, AI technician and sire was observed. However, some significant differences among bulls were detected in laboratory analyses. Sêmen from sire presenting numerically lower ($P > 0.05$) pregnancy/AI also presented lower ($P < 0.05$) total Motility after 2 hours of thermal incubation, lower ($P < 0.06$) Progressive Motility and Rapid Moving Cells after 2 hours of thermal incubation, higher ($P < 0.05$) Major and Total Defects, lower ($P < 0.05$) Length, Ellipticity and Fourier parameter (Fourier 0) in sperm morphometric analysis as well as higher ($P < 0.05$) chromatin heterogeneity. It was concluded that, although no bull effect was observed in the field experiment, the sire that presented numerically lower pregnancy/AI also presented lower semen quality according to the laboratory analyses performed.

Keywords: bull fertility, conception rate, timed-AI, sperm characteristics

1. Introdução

Os protocolos de IATF têm sido amplamente utilizados como importante ferramenta de manejo reprodutivo em sistemas de produção de gado de corte e leite (PURSLEY et al., 1995; BÓ et al., 2003; MADUREIRA & PIMENTEL, 2005; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009). Estes protocolos permitem o manejo simultâneo de grande número de vacas, reduzindo assim a mão de obra e facilitando o manejo animal (PURSLEY et al., 1995; BÓ et al., 2003).

Entretanto, muitas podem ser as causas responsáveis pela variação nos resultados e/ou pelos índices insatisfatórios dos programas de IATF em bovinos, destacando-se diversos fatores inerentes à fisiologia da fêmea como o escore de condição corporal (ECC), raça, categoria animal (novilhas ou vacas, primíparas ou pluríparas, animais em anestro ou ciclando), tamanho do folículo ovulatório e momento da ovulação (PERRY et al., 2007; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009).

Outro fator relacionado com o sucesso dos protocolos de IATF, mas que não tem recebido a devida atenção corresponde à qualidade das amostras de sêmen utilizadas nos programas. Diversos trabalhos demonstraram que touros diferem em sua capacidade individual de fecundação e/ou desenvolvimento embrionário após fertilização *in vitro* (FIV) (HILLERY et al., 1990; ZHANG et al., 1997; WEI & FUKUI, 1999; SUDANO et al., 2011). Além disso, acentuada variabilidade na fertilidade a campo pode ser observada entre reprodutores (CORREA et al., 1997; WARD et al. 2001, ANDERSSON et al. 2004), o chamado "efeito touro".

Muitos métodos de avaliação seminal *in vitro* têm sido utilizados para determinar a fertilidade do touro (REVELL & MRODE, 1994; CORREA et al., 1997; OSTERMEIER et al., 2001a; VERSTEGEN et al., 2002; JANUSKAUSKAS et al., 2003; Tartaglione & RITTA, 2004; BELETTI et al., 2005; AITKEN et al. 2007; CELEGHINI et al., 2007), mas os resultados desses testes nem sempre se correlacionam com os resultados de campo (SUDANO et al., 2011). No entanto, considerando a complexidade dos eventos envolvidos no processo de fertilização, é razoável considerar que o potencial de fertilidade do touro é melhor estimado quando uma combinação de diversas avaliações espermáticas é realizada (ARRUDA et al., 2011).

Embora reconhecido que muitos fatores inerentes à qualidade seminal podem influenciar os resultados dos programa de IA e/ou IATF, faltam trabalhos na literatura em que detalhada avaliação *in vitro* das características espermáticas tenha sido realizada, com o intuito de especificamente explorar a qualidade do sêmen utilizado em um programa de IATF. Assim, para fornecer informações que possam ajudar os pesquisadores a entender as principais causas das diferenças de fertilidade comumente observada entre touros, este estudo teve por objetivo investigar as taxas de concepção, bem como várias características espermáticas *in vitro*, de diferentes touros utilizados no mesmo programa de IATF.

2. Material e Métodos

2.1. Avaliação da fertilidade a campo

2.1.1. Animais

Um total de 947 vacas pluríparas lactantes, da raça Nelore, locadas em uma fazenda comercial no estado do Mato Grosso, foi utilizado neste estudo. Todos os animais foram mantidos em pasto composto por *Brachiaria brizantha* ou *Brachiaria decumbens*, suplementados com sal mineral e livre acesso à água. Os dados foram coletados de dezembro de 2010 a Janeiro de 2011, durante estação de monta determinada pela fazenda.

2.1.2. Manejo Reprodutivo

Após o parto, as vacas lactantes foram distribuídas em 8 lotes de aproximadamente 120 animais. Para primeiro serviço, todas as vacas receberam o mesmo protocolo de IATF 30 a 40 dias pós-parto. O protocolo de IATF se iniciou (dia 0) com as vacas recebendo um dispositivo intravaginal liberador de P4 (Sincrogest[®], Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil), de primeiro ou segundo uso, e uma injeção i.m. de 2,0 mg de BE (Sincrodiol[®], Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil). O dispositivo de P4 foi removido 8 dias após (dia 8), quando os animais receberam injeções (i.m.) de: 500 µg de PGF2α (d-cloprostenol; Sincrocio[®], Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil), 300 UI de eCG (Novormon 5000[®], Intervet Schering Plough Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 0,5 mg de ECP[®] (Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Dois dias após remoção do dispositivo de P4 (dia 10), as vacas foram inseminadas (IATF) por dois inseminadores experientes que se alternaram para cada animal inseminado.

Vale ressaltar que, após a retirada do dispositivo de P4 (isto é, depois do dispositivo ter sido utilizado durante 8 dias), o mesmo foi lavado, desinfetado, seco e armazenado em sacos de papel alumínio até ser novamente utilizado em outro

animal. Para desinfecção dos dispositivos de P4, o seguinte procedimento foi realizado: após serem removidos das vacas, os dispositivos foram lavados com água corrente para remoção de vestígios de muco vaginal e/ou qualquer outra sujidade. Em seguida, os mesmos foram imersos em solução de Biocid[®] 1% (Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil) durante 5 minutos, enxaguados novamente em água corrente, e secos ao ar em local protegido da luz solar.

A reutilização de dispositivos é uma prática rotineira nos programas de IATF realizados no Brasil. De acordo com MAIO et al. (2008) e MATURANA FILHO et al. (2010), os dispositivos Sincrogest[®] de primeira e segunda utilização mantiveram concentrações plasmáticas de P4 acima de 1ng/mL durante o tratamento (8 dias), o que permite que este dispositivo seja reutilizado em protocolos de sincronização da ovulação para IATF de bovinos.

2.1.3. Delineamento do experimento a campo

Para esse estudo, utilizaram-se doses congeladas de três diferentes touros Angus, sendo adquiridas três partidas de cada touro. Todas as doses foram oriundas da mesma empresa e diluídas no mesmo meio à base de leite. Aproximadamente 100 doses de cada partida de sêmen foram utilizadas.

O protocolo de descongelamento do sêmen foi realizado de acordo com a rotina da fazenda onde o experimento foi realizado. Neste protocolo de descongelamento, dez palhetas de sêmen de 0,5 mL (da mesma partida) foram descongeladas simultaneamente, em banho-maria termostaticamente controlado (Fertilize[®], Fertilize, Uberaba, Brasil), com a temperatura ajustada em 36°C, por 30 segundos, sendo utilizada uma palheta para cada vaca na IATF.

Para garantir um número equilibrado de animais por variável, o delineamento foi realizado de modo que o sêmen de cada uma das três partidas dos 3 touros fosse igualmente distribuídas entre lotes, inseminador e dispositivo de P4 (primeiro ou segundo uso).

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal 40 dias após IATF.

2.2. Avaliação laboratorial da qualidade seminal

2.2.1. Delineamento do experimento laboratorial

Doses de sêmen congeladas de cada touro ($n = 3$) e partidas ($n = 3$) utilizadas no experimento a campo foram analisadas no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, Pirassununga, SP, Brasil.

Com o objetivo de simular o procedimento de descongelamento de sêmen do experimento a campo, dez palhetas de 0,5 mL da mesma partida de sêmen foram descongeladas simultaneamente, em descongelador elétrico idêntico ao utilizado no experimento de campo (Fertilize[®]), na temperatura de 36°C. Após 30 segundos, duas palhetas de sêmen foram retiradas do descongelador e o sêmen oriundo dessas duas palhetas (palhetas A) foi colocado em um microtubo. As seguintes características espermáticas foram avaliadas: motilidade, termo-resistência após 2 horas de incubação, funcionalidade da membrana plasmática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, peroxidação lipídica, estrutura cromatínica e morfometria. Seis minutos e 29 segundos após avaliação das palhetas A, duas outras palhetas (palhetas B) foram retiradas do

descongelador, o sêmen oriundo dessas duas palhetas foi depositado em microtubo e as mesmas características espermáticas foram analisadas, sendo realizada uma repetição por partida.

O período de tempo entre a retirada das palhetas A e B do descongelador foi determinado de acordo com o experimento de campo, onde a média para a inseminação de dez vacas, que correspondia ao tempo em que a última (décima) palheta ficava incubada no descongelador, foi de seis minutos e 29 segundos.

2.2.2. Análise computadorizada da motilidade (sistema CASA)

A análise da motilidade espermática foi realizada pelo sistema CASA (Ivos-Ultimate®; Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, EUA). Ressalta-se, porém, que as amostras de sêmen utilizadas no presente experimento foram todas criopreservadas no mesmo diluidor a base de leite. Assim, na tentativa de tornar os espermatozoides mais visíveis, os espermatozoides foram corados com o corante Hoechst 33342 (H342; Molecular Probes Inc., Eugene, EUA), que torna o espermatozoide fluorescente quando luz ultravioleta é incidida sobre ele.

O sistema CASA foi pré-ajustado para a configuração “BOVINO” (CELEGHINI et al., 2008) na opção “IDENT”. Para avaliação no CASA, uma alíquota de 100 µL de sêmen descongelado foi depositado em microtubo e 2 µL de H342 (5 mg/mL) foi adicionado. Essa solução foi incubada a 37°C por 20 minutos. Após incubação, a motilidade espermática foi avaliada depositando-se 6 µL do sêmen (corado com H342) em lâmina de leitura padrão (Makler counting chamber, SEFI Medical Instruments LTD, Haifa, Israel) previamente aquecida a 37°C, a qual foi inserida no aparelho Hamilton Thorne. Seis campos foram aleatoriamente

selecionados para cada amostra. As variáveis da cinética espermática analisadas foram: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (PM; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude lateral da cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade (LIN; %) e células com velocidade rápida (RAPID; %).

2.2.3. Avaliação da termo-resistência espermática após 2 horas de incubação

Para esta avaliação, uma alíquota de 250 μL do sêmen descongelado foi colocada em microtubo pré-aquecido que ficou incubado a 37°C durante 2 horas. As amostras incubadas foram avaliadas realizando-se o mesmo procedimento descrito na seção 2.2.2. As variáveis avaliadas pelo CASA foram: TM_2h, PM_2h, VAP_2h, VSL_2h, VCL_2h, ALH_2h, BCF_2h, STR_2h, LIN_2h, RAPID_2h.

2.2.4. Teste Hipo-osmótico (HOST)

O HOST foi realizado depositando-se 20 μL de sêmen em 1 mL de solução hipo-osmótica (100 mOsm; REVELL & MRODE, 1994) a 37°C durante 60 minutos. Após esse período, uma alíquota de 20 μL do sêmen diluído na solução foi colocada entre lâmina e lamínula e avaliada por microscopia de contraste de fase. Duzentos espermatozoides foram avaliados em aumento de 1000X. A porcentagem de espermatozoides viáveis (células + HOST) foi calculada de acordo com REVELL & MRODE (1994).

2.2.5. Análises seminais por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para avaliação simultânea das membranas plasmática e acrossomal e também para avaliação da peroxidação lipídica.

As análises foram realizadas utilizando citômetro de fluxo BD FACSAria[®] (Becton Dickinson, San Jose, EUA) equipado com laser “Near” UV de 405 nm e laser de argônio de 488 nm e fotomultiplicadores (PMT) B (Band Pass 450/20), C (Long Pass 595 nm/Band Pass 610/20 nm), D (Long Pass 556 nm/ Band Pass 575/26 nm) e E (Long Pass 502 nm/ Band Pass 530/30 nm). O aparelho foi previamente calibrado como descrito por De ANDRADE et al. (2011).

Após serem submetidas às colorações específicas para cada avaliação, as amostras foram diluídas em meio TALP modificado (TALPm; pH 7,4), composto por NaCl (114 mM), KCl (3,2 mM), MgCl₂.6H₂O (0,5 mM), NaH₂PO₄.H₂O (0,4 mM), glicose (5 mM), lactato de sódio (10 mM), piruvato de sódio (0,1 mM) e penicilina sódica (10.000U/100 mL). No citômetro de fluxo, o sistema computacional BD FACSDiva[™] 6.0 software (Becton-Dickinson) foi utilizado como descrito por LEITE et al. (2010).

2.2.5.1. Avaliação simultânea das membranas plasmática e acrossomal

Para avaliar as células com membranas plasmática e acrossomal intactas, uma alíquota de sêmen foi retirada das amostras e adicionado meio TALPm, de modo que as amostras resultantes apresentavam concentração de 5x10⁶ espermatozoides/mL em volume de 148 uL. Em seguida, 2 uL de H342 (40 ug/mL) foi adicionado para que o DNA das células fossem corados, de modo que apenas espermatozoides fossem considerados na amostra. Após 10 minutos de incubação a 37°C, 3 uL de iodeto de propídio (PI; 0,5 mg/mL; Sigma-Aldrich, St.

Louis, EUA) e 10 uL de aglutinina de *Pisum Sativum* conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 ug/mL; Sigma-Aldrich) foram adicionados às amostras (CELEGHINI et al., 2007). Após 10 minutos de incubação a 37°C, com a adição de 150 uL de TALPm, as amostras foram diluídas na concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL para serem então analisadas por citometria de fluxo (De ANDRADE et al., 2011).

A associação das sondas fluorescentes FITC-PSA gerou quatro populações de células: (1) AIMI: espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas; (2) AIML: espermatozoides com membrana plasmática lesionada e membrana acrossomal intacta; (3) ALMI: espermatozoides com membrana plasmática intacta e membrana acrossomal lesionada; (4) ALML: espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal lesionadas (LEITE et al., 2010). A porcentagem de espermatozoides apresentando membrana plasmática intacta (MPI: AIMI + ALMI) e a porcentagem de espermatozoides apresentando acrossoma intacto (Acl: AIMI + AIML) também foram calculadas.

2.2.5.2. Avaliação da peroxidação lipídica

Para avaliação da peroxidação lipídica, retirou-se uma alíquota das amostras que foram diluídas em TALPm na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL, em volume final de 499,5 uL. Em seguida, a sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591} (1mg/mL, Molecular Probes Inc., Eugene, EUA) foi adicionada. Essa amostra foi incubada durante 30 minutos a 37°C. Após este período de incubação, 145 uL desta solução foi transferida para outro microtubo e adicionou-se 2 uL de H342 (40 µg/mL). Esta amostra foi então incubada durante

10 minutos a 37°C. A sonda H342 foi utilizada a fim de evitar que outras partículas com mesmo tamanho e/ou granularidade que as células espermáticas fossem incluídas na contagem. Assim, após incubação com H342, 3 uL de PI (0,5 mg/mL) foram adicionados à amostra para que as células com membrana plasmática lesionada fossem identificadas. Subsequentemente, a amostra foi incubada com PI durante 5 minutos a 37°C. Por fim, a amostra foi diluída com TALPm na concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL para ser analisada por citometria de fluxo.

A coloração das amostras pela sonda C11-BODIPY^{581/591} gerou quatro populações de células: (1) MINP: espermatozoides com membrana plasmática íntegra e reduzida peroxidação lipídica (células não peroxidadas; baixa fluorescência); (2) MIP: espermatozoides com membrana plasmática íntegra e elevada peroxidação lipídica (células peroxidadas; alta fluorescência). (3) MLNP: espermatozoides com membrana plasmática lesionada e reduzida peroxidação lipídica; (4) MLP: espermatozoides com membrana plasmática lesionada e elevada peroxidação lipídica (ZAFFALON, 2009).

2.2.6. Avaliação da morfologia espermática

Para avaliação da morfologia espermática, as amostras de sêmen foram diluídas e fixadas em formaldeído-PBS pré-aquecido (37°C). As células (n = 200) foram avaliadas sob microscopia de contraste de interferência diferencial (modelo 80i; Nikon, Tokyo, Japan) com aumento de 1000X. As características morfológicas dos espermatozoides foram classificadas como defeitos maiores e defeitos menores, de acordo com BLOM (1973).

2.2.7. Avaliação da estrutura cromatínica e morfometria espermática

Para esta análise, dois esfregaços foram preparados para cada amostra. Os esfregaços foram fixadas com etanol e ácido acético (3:1, V/V) durante 1 minuto e etanol 70% durante 3 minutos. Em seguida, os esfregaços foram imergidos em solução de hidrólise (HCL 4M) por 25 minutos, lavados em água destilada e secos em temperatura ambiente. Uma gota de Azul de toluidina 0,025% (tampão citrato-fosfato sódico; pH 4,0), foi colocada sobre cada esfregaço e, em seguida, coberta com lamínula.

Para cada esfregaço, 50 imagens digitais foram aleatoriamente obtidas em tons de cinza, utilizando-se microscópio Leica DM500 (Leica Microsystems Inc., BuffaloGrove, EUA) com objetiva de 1000X acoplada à câmera Leica ICC50 (Leica Microsystems Inc.), conectada a um microcomputador. O limiar de segmentação de imagens foi baseado nos estudos de BELETTI & COSTA (2003), obtendo-se pelo menos 100 cabeças espermáticas para cada esfregaço. Após a segmentação das cabeças espermáticas utilizando-se algoritmos desenvolvidos em ambiente SCILAB (SIP toolbox), as imagens foram analisadas, para primeiramente se obter o valor médio de pixel a partir do valor de cada cabeça espermática. As seis cabeças com os menores valores de pixel foram automaticamente definidas como cabeças-padrão. Estas, teoricamente, são as cabeças que apresentam cromatina mais condensada. Subsequentemente, para cada imagem, a diferença entre o valor padrão do esfregaço e o valor médio de cada cabeça analisada foi determinada. Esta diferença foi transformada na percentagem (Dif; %) do valor médio de pixel em relação as cabeças-padrão, que indica a porcentagem de descondensação cromatínica. O coeficiente de variação (CV) da intensidade da

escala de cinza para cada cabeça, que indica heterogeneidade da cromatina espermática, também foi calculada (KANAYAMA & BELETTI, 2011).

Ainda nesta técnica, área, perímetro, largura, comprimento, elipticidade e a razão largura:comprimento das cabeças espermáticas foram determinados. Da mesma forma, a simetria lateral da cabeça espermática foi mensurada para identificação de assimetrias ao longo do eixo principal do espermatozoide. Este cálculo envolve inverter a cabeça espermática ao longo do seu maior eixo (eixo vertical) e, em seguida, identificar a área de sobreposição entre as áreas “original” e “invertida” (BELETTI et al., 2005a; 2005b).

Descritores Fourier (Fourier 0, Fourier 1, Fourier 2) também são calculados na análise da morfometria espermática. Para aferição dos índices Fourier, as análises de imagem são utilizadas para obter coordenadas cartesianas que definem os perímetros da cabeça de 100 espermatozoides por touro. As coordenadas cartesianas são convertidas para coordenadas polares e em seguida, para funções trigonométricas, chamadas amplitudes harmônicas (ou funções Fourier). Desta forma, as funções Fourier usam amplitudes harmônicas como medidas multivariadas para mensurar a curvatura do perímetro espermático (OSTERMEIER et al., 2001b). Portanto, as amplitudes harmônicas de forma (ou seja, índices Fourier) são uma potencial mensuração para a avaliação da curvatura do perímetro espermático, estando estas relacionadas com o formato do núcleo do espermatozoide (OSTERMEIER et al., 2001b).

2.3.1. Análise estatística do experimento a campo

Taxa de concepção 40 dias após IATF foi analisada pelo programa GLIMMIX do SAS (versão 9.2, SAS Inst. Inc., Cary, NC). Lote (1 a 8), ECC (1,75-3,25), tipo de dispositivo de P4 (primeiro ou segundo uso), inseminador (1 e 2) e touro (1, 2 e 3) foram incluídos no modelo, onde $P < 0,05$ foi considerado significativo.

2.3.2. Análise estatística do experimento laboratorial

Os resultados obtidos a partir de todas as análises laboratoriais foram testados quanto à normalidade de resíduos e da homogeneidade da variância. As variáveis dependentes que não satisfizeram as premissas estatísticas foram submetidas à transformação de arco-seno. Para cada touro ($n = 3$), reuniu-se os dados obtidos nos dois tipos de palheta (palhetas A e B), para cada uma das três partidas ($n = 6$). Esses dados foram submetidos à análise de variância (PROC GLM) e as diferenças entre touros foram separados pelo teste de Tukey, onde $P < 0,05$ foi considerado significativo.

3. Resultados e discussão

Em bovinos, o sucesso dos programas de IA depende do uso de sêmen de boa qualidade, onde melhores taxas de concepção podem ser obtidas quando touros com bom histórico de fertilidade são utilizados durante a estação de monta (SUDANO et al., 2011). Em vacas de corte, a lactação, o balanço energético negativo, o ECC, e o número de partições são importantes fatores que interferem nos índices de gestação (MENEGETTI et al., 2009). Adicionalmente, lote,

protocolos hormonais e inseminador são fatores extremamente importantes para os resultados da IATF (SÁ FILHO et al., 2009). No presente estudo, de acordo com os resultados da taxa de concepção aos 40 dias pós-IA, não foi observado efeito de lote ($P = 0,7658$), ECC ($P = 0,4485$), inseminador ($P = 0,4312$), tipo de dispositivo de P4 ($P = 0,2078$) e touro ($P = 0,4518$). Assim, permite-se considerar que as variáveis da IATF foram bem distribuídas entre os lotes do presente experimento a campo.

No que diz respeito à qualidade do sêmen utilizado nos programas de AI, destaca-se que diferenças de fertilidade podem ser atribuídas às variações qualitativas das características espermáticas (CORRÊA et al., 1997). WARD et al. (2001) demonstraram que a cinética do desenvolvimento embrionário pode variar entre touros. ANDERSSON et al. (2004) observaram alta variabilidade na fertilidade entre touros usando diferentes concentrações espermáticas por dose inseminante. No presente experimento, porém, não se observou efeito significativo de touro, onde taxas de concepção satisfatórias foram obtidas para os três reprodutores testados.

Todavia, diferenças significativas entre os touros foram observadas em algumas características espermáticas avaliadas *in vitro*. Os resultados referentes a taxa de concepção e as características de motilidade dos três touros utilizados no programa de IATF do presente experimento estão demonstrados na Tabela 1.

Os dados descritivos da taxa de concepção de cada partida estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Taxa de concepção (TC) e parâmetros da motilidade *in vitro* (média \pm desvio padrão) após 0 e 2 hs de incubação (à 37°C) obtidas na análise do sêmen dos três touros utilizados no programa de IATF

	Touro 1	Touro 2	Touro 3	Valor de P
TC (%; n/n)	49,13 (142/289)	47,59 (148/311)	52,74 (183/347)	0,4518
TM (%)	44,53 \pm 8,83	29,40 \pm 8,91	43,59 \pm 15,32	0,0669
PM (%)	36,87 \pm 10,56	24,72 \pm 7,04	30,28 \pm 9,66	0,1213
VAP (μm/s)	62,75 \pm 8,04	63,15 \pm 4,59	56,56 \pm 3,47	0,1144
VSL (μm/s)	56,71 \pm 7,99 ^a	56,54 \pm 3,43 ^a	48,60 \pm 3,56 ^b	0,0318
VCL (μm/s)	89,46 \pm 9,69	93,24 \pm 6,59	87,42 \pm 7,42	0,4603
ALH (μm)	3,94 \pm 0,22	4,12 \pm 0,25	4,45 \pm 0,63	0,1327
BCF (Hz)	25,04 \pm 3,25	24,90 \pm 3,44	24,80 \pm 4,07	0,9936
STR (%)	90,49 \pm 1,95 ^a	89,99 \pm 1,59 ^a	86,56 \pm 3,92 ^b	0,0478
LIN (%)	66,17 \pm 3,79 ^a	63,71 \pm 1,93 ^{ab}	58,54 \pm 6,15 ^b	0,0236
RAPID (%)	38,28 \pm 10,93	25,63 \pm 7,35	33,24 \pm 11,53	0,1384
TM_2h (%)	16,25 \pm 9,22 ^a	6,11 \pm 3,63 ^b	24,35 \pm 16,65 ^a	0,0404
PM_2h (%)	12,42 \pm 8,74 ^A	4,06 \pm 2,42 ^B	14,55 \pm 8,80 ^A	0,0577
VAP_2h (μm/s)	54,39 \pm 6,98	49,50 \pm 4,75	53,95 \pm 6,07	0,3234
VSL_2h (μm/s)	47,51 \pm 6,42	41,94 \pm 3,98	44,54 \pm 5,03	0,2164
VCL_2h (μm/s)	84,11 \pm 10,28	82,00 \pm 8,91	89,75 \pm 11,40	0,4216
ALH_2h (μm)	3,96 \pm 0,48	4,00 \pm 0,68	4,62 \pm 0,67	0,1480
BCF_2h (Hz)	22,87 \pm 4,01	20,67 \pm 6,10	24,77 \pm 2,00	0,2957
STR_2h (%)	88,18 \pm 1,34 ^a	85,28 \pm 1,30 ^b	83,63 \pm 1,16 ^b	0,0001
LIN_2h (%)	60,42 \pm 4,47 ^a	54,31 \pm 3,33 ^b	52,80 \pm 1,03 ^b	0,0026
RAPID_2h (%)	13,13 \pm 9,08 ^A	4,33 \pm 2,71 ^B	16,33 \pm 10,15 ^A	0,0527

IATF: inseminação artificial em tempo fixo; TM: motilidade total; PM: motilidade progressiva; VAP: Velocidade de trajeto uniforme; VSL: Velocidade progressiva; VCL: Velocidade curvilínea; ALH: Amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF: Frequência de batimento; STR: Retilinearidade; LIN: Linearidade; RAPID: porcentagem de células rápidas; TM_2h: TM após 2 horas; PM_2h: PM após 2 horas; VAP_2h: VAP após 2 horas; VSL_2h: VSL após 2 horas; VCL_2h: VCL após 2 horas; ALH_2h: ALH após 2 horas; LIN_2h: LIN após 2 horas; RAPID_2h: RAPID após 2 horas; ^{a,b} valores com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam ($P < 0,05$); ^{A,B} valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam ($P < 0,06$).

Tabela 2. Dados descritivos, por partida, da taxa de concepção dos três touros utilizados no programa de IATF

	Touro 1	Touro 2	Touro 3
Partida 1	50,00 (49/98)	51,52 (51/99)	58,00 (87/150)
Partida 2	53,85 (56/104)	48,65 (54/111)	46,94 (46/98)
Partida 3	42,53 (37/87)	42,57 (43/101)	50,51 (50/99)
Total	49,13 (142/289)	47,59 (148/311)	52,74 (183/347)

O sistema CASA possibilita que diversas características espermáticas sejam avaliadas com alta repetibilidade (FARRELL et al., 1998; VERSTEGEN et al., 2002). De acordo com FARRELL et al. (1998), combinações das variáveis da análise computadorizada da motilidade, como a combinação BCF, LIN, VAP, VSL e VCL, apresentaram alta correlação ($r^2 = 0,97$) com a fertilidade a campo. No presente estudo, resultados intrigantes foram obtidos na avaliação pelo CASA. Os valores obtidos para VSL, STR e LIN foram inferiores ($P < 0,05$) no touro que apresentou maior valor numérico ($P > 0,05$) na fertilidade a campo (Touro 3). No entanto, curiosamente, embora a taxa de concepção no touro 2 tenha se apresentado apenas numericamente ($P > 0,05$) inferior em relação aos outros touros, uma tendência ($P = 0,07$) para menor TM também foi observada para este reprodutor. Neste sentido, CORRÊA et al. (1997) observaram que a quantidade de espermatozoides móveis na amostra tendeu a ser maior em touros de alta fertilidade do que em touros de baixa fertilidade dentre os reprodutores avaliados.

O período de incubação de 2 horas à 37°C teve por objetivo aumentar a possibilidade de ocorrência de lesões espermáticas e/ou identificar possíveis diferenças na resistência térmica do sêmen dos três touros utilizados. É interessante notar que algumas variáveis avaliadas após 2 horas de incubação (TM_2h, PM_2h e RAPID_2h) foram menores ($P < 0,05$) para o Touro 2 em comparação aos Touros 1 e 3. Assim, nota-se que o sêmen congelado do Touro 2 parece ser mais suscetível a redução na porcentagem de espermatozoides móveis após incubação térmica *in vitro* à 37°C, por 2 horas,. Este resultado poderia ser um indicativo de menor capacidade de sobrevivência espermática dentro do

aparelho reprodutor da fêmea, porém, como a campo apenas diferenças numéricas foram observadas entre touros, esta suposição não pode ser afirmada.

Embora as análises computadorizadas forneçam alta acurácia na avaliação da motilidade *in vitro* (FARRELL et al., 1998; VERSTEGEN et al., 2002), acredita-se que a avaliação de diferentes aspectos relacionados à fisiologia espermática podem assegurar melhor investigação da qualidade seminal (CELEGHINI et al., 2007; ARRUDA et al., 2011). Os resultados laboratoriais referentes à integridade e funcionalidade de membrana, estresse oxidativo e morfologia espermática dos três touros utilizados no presente programa de IATF estão demonstrados na Tabela 3.

Na avaliação de integridade de membranas plasmática e acrossomal não foram observadas diferenças significativas entre touros. Entretanto, vale mencionar que o Touro 2 também apresentou menores valores numéricos para células positivas no HOST, AIMI, IPM e Acl (Tabela 3); o que pode estar relacionado com a taxa de concepção numericamente inferior observada para este touro na IATF. Neste sentido, JANUSKAUSKAS et al. (2003) observaram correlações significativas entre a fertilidade a campo e integridade da membrana plasmática avaliada pelo PI ($r^2 = 0,56$). TARTAGLIONE & RITTA (2004) demonstraram que a combinação dos testes de coloração por Eosina/Negrosina e HOST apresentou alta correlação com a fertilidade *in vitro* ($r^2 = 78,2$). Quando os resultados de integridade de membranas plasmática e acrossomal foram incluídos no modelo de regressão, um coeficiente de correlação ainda maior ($r^2 = 82,4$) foi obtido (TARTAGLIONE & RITTA, 2004).

Tabela 3. Média \pm desvio padrão das análises do teste hipo-osmótico (HOST), da integridade das membranas plasmática e acrossomal, da peroxidação lipídica e da morfologia espermática do sêmen dos três touros utilizados no programa de IATF.

Variável (%)	Touro 1	Touro 2	Touro 3	Valor de P
Células + HOST	34,33 \pm 5,32	30,50 \pm 13,22	44,67 \pm 17,31	0,1782
AIMI	38,60 \pm 6,39	35,10 \pm 5,66	44,63 \pm 12,08	0,1917
MPI	38,88 \pm 6,56	35,37 \pm 5,78	44,78 \pm 12,13	0,1904
Acl	67,27 \pm 15,12	65,68 \pm 10,67	78,40 \pm 15,59	0,1689
MLNP	68,35 \pm 5,41	68,32 \pm 6,31	58,97 \pm 16,26	0,2975
MLP	1,05 \pm 0,60	2,75 \pm 1,89	1,47 \pm 1,16	0,0751
MINP	30,18 \pm 5,11	27,62 \pm 5,30	39,15 \pm 15,59	0,1855
MIP	0,43 \pm 0,18	1,33 \pm 1,40	0,43 \pm 0,23	0,0821
Total Peroxidadas	1,48 \pm 0,76	4,08 \pm 3,26	1,90 \pm 1,32	0,0689
Def maiores	14,25 \pm 3,09 ^a	25,33 \pm 3,42 ^b	11,83 \pm 3,04 ^a	<0,0001
Def menores	10,00 \pm 3,86 ^a	9,67 \pm 2,68 ^a	16,00 \pm 4,52 ^b	0,0232
Total defeitos	24,25 \pm 3,60 ^a	35,00 \pm 1,76 ^b	27,83 \pm 6,93 ^a	0,0040

Células + HOST: porcentagem de espermatozoides viáveis no teste Hipo-osmótico; AIMI: espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas; MPI: espermatozoides com membrana plasmática intacta; Acl: espermatozoides com acrossoma intacto; MINP: espermatozoides com membrana plasmática íntegra e reduzida peroxidação lipídica; MIP: espermatozoides com membrana plasmática íntegra e elevada peroxidação lipídica; MLNP: espermatozoides com membrana plasmática lesionada e reduzida peroxidação lipídica; MLP: espermatozoides com membrana plasmática lesionada e elevada peroxidação lipídica; ^{a,b} valores com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam ($P < 0,05$).

A ocorrência de estresse oxidativo nos espermatozoides também foi investigada no presente estudo. Espermatozoides são altamente susceptíveis a oxidação da membrana plasmática devido à presença de ácidos graxos poliinsaturados (AITKEN et al., 2007). As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem interferir no movimento espermático e tornar-se citotóxica, causando danos às proteínas, ácidos nucleicos e lípidos de membrana, quando suas concentrações superam os mecanismos de defesa natural da célula (STOREY,

1997). KASIMANICKAM et al. (2007) observaram que touros apresentando maior peroxidação lipídica de espermatozoides foram mais suscetíveis a apresentar alta fragmentação de DNA e baixa integridade de membrana plasmática. Ainda, foi demonstrado que estes touros apresentaram menores chances de produzir bezerras (KASIMANICKAM et al., 2007). Na avaliação da peroxidação lipídica do presente estudo, embora nenhuma diferença significativa tenha sido observada entre os touros, uma tendência de maior percentagem de células MIP ($P = 0,0821$) e MLP ($P = 0,0751$) foi detectada para o touro 2, o que pode sugerir também maior susceptibilidade ao estresse oxidativo no sêmen congelado deste touro específico.

Tem sido ainda relatado que touros de baixa fertilidade geralmente apresentam sêmen com elevada quantidade de células morfologicamente anormais (SAACKE, 2008). Classicamente, espermatozoides com cabeças anormais não possuem capacidade de acessar o oócito, pois não atravessam o trato reprodutivo feminino e/ou não participam da fertilização (SAACKE et al., 1998). Até porque, mesmo pequenas diferenças geométricas na morfologia da cabeça espermática podem causar diferenças na hidrodinâmica da célula (DRESDNER & KATZ, 1981). Portanto, o maior ($P < 0,05$) percentual de defeitos maiores e totais observado no Touro 2 também pode ter contribuído para a menor ($P > 0,05$) taxa de concepção deste touro na IATF.

A porcentagem de cabeças espermáticas de formas anormais também deve ser investigada quando avalia-se a fertilidade do reprodutor (SAACKE, 2008). De acordo com SAACKE (2008), o reconhecimento da existência de células não compensáveis no ejaculado é baseado em níveis elevados de espermatozoides com cabeças disformes.

Os resultados referentes a morfometria espermática e estrutura cromatínica dos três touros utilizados no presente trabalho estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Média \pm desvio padrão das análises da morfometria e estrutura cromatínica do sêmen dos três touros utilizados no programa de IATF.

	Touro 1	Touro 2	Touro 3	Valor P
Area	5355,71 \pm 419,82	5291,78 \pm 134,28	5353,50 \pm 152,44	0,8975
Perímetro	23,96 \pm 0,91	23,62 \pm 0,25	23,96 \pm 0,33	0,5126
Largura	4,68 \pm 0,20	4,71 \pm 0,09	4,66 \pm 0,09	0,7855
Comprimento	8,98 \pm 0,35 ^{ab}	8,77 \pm 0,09 ^a	9,00 \pm 0,12 ^b	0,0032
L/C	0,521 \pm 0,004 ^a	0,538 \pm 0,007 ^b	0,518 \pm 0,008 ^a	0,0003
Elipicidade	0,315 \pm 0,004 ^a	0,301 \pm 0,006 ^b	0,318 \pm 0,007 ^a	0,0003
Fourier 0	3885,09 \pm 282,82 ^a	3596,09 \pm 60,59 ^b	3916,50 \pm 118,64 ^a	0,0140
Fourier 1	433,54 \pm 64,82 ^{ab}	434,03 \pm 28,13 ^a	494,22 \pm 35,97 ^b	0,0103
Fourier 2	325,03 \pm 33,05	325,20 \pm 24,47	329,89 \pm 23,52	0,9409
Simetria Lat	0,972 \pm 0,003	0,973 \pm 0,001	0,974 \pm 0,002	0,1558
Dif (%)	6,09 \pm 2,89	7,92 \pm 3,04	7,25 \pm 4,65	0,6793
CV (%)	8,37 \pm 3,33 ^{ab}	10,86 \pm 1,12 ^a	8,40 \pm 1,88 ^b	0,0411

IATF: Inseminação artificial em tempo fixo; L/C: razão largura:comprimento; Simetria Lat: simetria lateral; CV: Heterogeneidade cromatínica; Dif%: Porcentagem de espermatozoides com cromatina descompactada; ^{a,b} valores com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam (P < 0,05).

ACEVEDO et al. (2002) relataram que a vulnerabilidade do DNA espermático foi positivamente associado com a porcentagem de cabeças espermáticas anormais. Estes resultados forneceram mais suporte para a suposição de que a ocorrência de espermatozoides com cabeças de forma anormal pode sinalizar anormalidades na cromatina e incompetência do potencial de fertilização da amostra seminal (SAACKE, 2008). Neste sentido, no presente experimento, o Touro 2, que apresentou numericamente menor taxa de

concepção, de fato apresentou mais alterações morfométricas. Valores inferiores ($P < 0,05$) para comprimento e elipicidade, assim como valor superior ($P < 0,05$) para a relação largura:comprimento, foram observados para este touro quando comparado com os Touros 1 e 3. Adicionalmente, os resultados de morfometria espermática e estrutura de cromatina do presente trabalho parecem estar relacionados. Maiores heterogeneidade ($P < 0,05$) e descondensação ($P > 0,05$) da cromatina foram também observadas no touro que apresentou mais alterações morfométricas de espermatozoides (Touro 2).

Segundo OSTERMEIER et al. (2001b), a quantificação de espermatozoides com cabeças anormais pode ser detectada pelos índices Fourier, que caracterizam o perímetro curvilíneo da cabeça espermática usando amplitudes harmônicas para descrever a forma do núcleo espermático. No presente trabalho, resultados interessantes foram obtidos em relação aos índices Fourier. Menor ($P < 0,05$) Fourier 0 foi observado no Touro 2 comparado com os Touros 1 e 3. Ainda, menor ($P < 0,05$) Fourier 1 foi observado no Touro 2 (numericamente menor taxa de concepção) em relação ao Touro 3 (numericamente maior taxa de concepção). Os estudos aqui apresentados parecem estar em concordância com OSTERMEIER et al. (2001a) que investigaram a relação entre a fertilidade do reprodutor e os índices Fourier. Os autores observaram que estas variáveis foram capazes de detectar pequenas diferenças na forma nuclear de espermatozoides de touros com diferentes fertilidades. Touros classificados como sendo de alta fertilidade apresentaram significativamente maior Fourier 1 (e numericamente maior Fourier 0 e 2) do que touros classificados como sendo de baixa fertilidade, dentro os touros avaliados (OSTERMEIER et al., 2001a).

4. Conclusão

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que apenas touros de boa fertilidade a campo foram utilizados no presente estudo, o que contribuiu para as satisfatórias taxas de concepção obtidas no programa de IATF das vacas Nelore pós-parto. Embora não tenha sido observado efeito de touro no experimento a campo, o reprodutor que apresentou numericamente menor taxa de concepção, também apresentou inferior qualidade seminal, de acordo com as análises laboratoriais realizadas. Ainda que tenham demonstrado semelhante fertilidade a campo, os touros do presente experimento parecem diferir em diversas características espermáticas *in vitro*.

Ressalta-se, entretanto, que apenas três touros foram utilizados no presente experimento e que estudos adicionais devem ser realizados utilizando-se maior número de reprodutores. Por fim, maiores estudos que contribuam para a compreensão das diferenças seminais entre touros, que possam estar relacionadas com as diferenças nas taxas de fertilidade frequentemente observadas nos programas de IA/IATF, devem ser incentivados.

IV. CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DE DIVERSAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS *IN VITRO* NA PREDIÇÃO DA FERTILIDADE A CAMPO APÓS UM PROGRAMA DE IATF BOVINO*

***Capítulo baseado no artigo científico enviado para publicação no periódico “Animal Reproduction Science”**

Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate following a bovine timed-AI program

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a fertilidade *in vivo*, bem como diversas características seminais *in vitro* de diferentes touros e identificar as variáveis importantes na predição da taxa de concepção. Para a realização deste estudo, utilizaram-se os dados de 191 Vacas Nelores pluríparas que foram submetidas ao mesmo protocolo de IATF em uma mesma fazenda comercial. Doses de sêmen congelado de três touros Angus e três partidas de cada touro foram utilizadas. O protocolo de descongelamento do sêmen foi realizado de acordo com o procedimento de rotina da fazenda. O mesmo procedimento de descongelamento foi repetido no laboratório para simular as condições de campo. As seguintes análises seminais *in vitro* foram realizadas: concentração, morfologia, análise computadorizada do movimento espermático, avaliação da termo-resistência espermática após 2 horas de incubação, teste hipo-ósmotico (HOST), análise das membranas plasmáticas e acrossomal por PI/FITC-PSA, análises da estabilidade

da membrana plasmática por Yo-Pro/M540, análise da peroxidação lipídica por C11-BODIPY^{581/591}, morfometria espermática e estrutura cromatínica pelo corante Azul de Toluidina. Para análise estatística, o método dos mínimos quadrados parciais (PLS) foi utilizado para explorar a importância das variáveis *in vitro* na predição da fertilidade *in vivo* das amostras seminais. As seguintes características espermáticas *in vitro* foram selecionadas como importantes na predição da taxa de concepção: TM, PM, VAP, BCF, RAP, TM_2h, PM_2h, VAP_2h, BCF_2h, RAP_2h, células + HOST, AIMI (espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras), MIAD (espermatozoides com membrana plasmática íntegra e alto grau de desorganização da bicamada lipídica), MIP (espermatozoides com membrana plasmática íntegra sofrendo peroxidação lipídica), defeitos maiores, defeitos totais, razão largura:comprimento, Fourier 0, Fourier 2, heterogeneidade cromatínica e concentração espermática. Conclui-se ainda, que o método estatístico PLS permitiu selecionar um grupo de características espermáticas melhor correlacionadas com a fertilidade a campo do touro.

Palavras-chave: características espermáticas, IATF, PLS, taxa de concepção.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess *in vivo* fertility as well as several *in vitro* sperm characteristics of different sires and to identify important sperm variables in the prediction of conception rate. Multiparous Nelore cows (n = 191) from a commercial farm were submitted to the same timed-AI protocol. Frozen semen doses from three Angus bulls and three batches of each bull were used. Semen

thawing protocol was performed according to the farm routine. The same thawing procedure was repeated in the laboratory to mimic the field conditions. The following *in vitro* sperm analysis were performed: sperm morphology, concentration, Computer Assisted Sêmen Analysis (CASA), thermal-resistance after 2 hours of incubation, Hiposmotic Swelling Test (HOST), assessment of plasma and acrosomal membranes by PI/FITC-PSA, assessment of sperm plasma membrane stability by Yo-Pro/M540, assessment of lipid peroxidation by C11-BODIPY^{581/591}, assessment of sperm morphometry and chromatin structure by Toluidine Blue staining. For statistical analysis, the Partial Least Squares (PLS) was used to explore the importance of the variables in the prediction of conception rate. The following *in vitro* sperm variables were selected as important predictors of conception rate: TM, PM, VAP, BCF, RAP, TM_2h, PM_2h, VAP_2h, BCF_2h, RAP_2h, HOST + cells, AIMI (sperm with intact plasma and acrosomal membranes), MIAD (sperm with high lipid bilayer disorganisation), MIP (sperm with intact plasma membrane suffering lipid peroxidation), major defects, total defects, width/length ratio, fourier_0, fourier_2, chromatin heterogeneity and sperm concentration. We also concluded that PLS was a suitable statistical method to select a group of *in vitro* sperm characteristics best correlated with bull fertility.

Keywords: conception rate, timed-AI, Partial Least Squares, sperm characteristics

1. Introdução

Muitos métodos clássicos e modernos têm sido utilizados para avaliação laboratorial da qualidade espermática de touros após criopreservação (REVELL & MRODE, 1994; VERSTEGEN et al., 2002; BROUWERS & GADELLA, 2003; BELETTI et al., 2005; CHELEGHINI et al., 2007; KASIMANICKAM et al., 2007). Entretanto, tais resultados nem sempre se correlacionam com a real fertilidade da amostra seminal (ZHANG et al., 1999; SUDANO et al., 2011).

As relações da qualidade seminal *in vitro* com a fertilidade a campo tem sido o tema de vários estudos (AMANN, 1989; FARRELL et al., 1998; ZHANG et al., 1999; LARSSON & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; SUDANO et al., 2011) porém, até o atual momento, a forma mais eficiente para estimar a fertilidade individual de um touro é através dos testes de fertilidade a campo, que são onerosos e demorados (ZHANG et al., 1999; LARSSON & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000).

As técnicas de cultivo embrionário tem permitido explorar a fertilidade *in vitro* de reprodutores bovinos, onde correlações positivas ($r^2 < 0.4$ a 0.6) entre a produção *in vitro* de embriões e a fertilidade espermática *in vivo* têm sido relatadas (MARQUANT-LE GUIENNE et al., 1990; LONERGAN, 1994; ZHANG et al. 1997; LARSSON & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000; WARD et al., 2001; SUDANO et al., 2011). Neste sentido, SUDANO et al. (2011) demonstraram que é possível estimar a fertilidade do touro baseando-se nos resultados da PIV, utilizando modelos de interferência estatística Bayesiana. Apesar destes interessantes resultados, ainda é incerto se a habilidade de um touro em fertilizar oócitos *in vitro* é de fato eficiente

em prever a fertilidade *in vivo* deste animal após IA. Adicionalmente, técnicas laboratoriais mais práticas e simples para avaliar-se a qualidade seminal seriam mais vantajosas para a indústria de sêmen do que os procedimentos de PIV.

Mesmo sendo evidente que a identificação de um método prático de análise seminal *in vitro*, que fosse capaz de determinar a fertilidade do touro e substituísse por completo a necessidade de experimentos a campo, seria de grande benefício para os programas de IA (WARD et al., 2001), é improvável que a avaliação de uma única característica espermática possa refletir a real capacidade fecundante da amostra seminal (ARRUDA et al., 2007). Portanto, encontrar um grupo de características espermáticas consideradas importantes em prever a taxa de concepção seria um método útil para monitorar e/ou prever a fertilidade do touro.

Com o intuito de fornecer informações que possam ajudar pesquisadores a selecionar um conjunto de análises laboratoriais melhor correlacionadas com a fertilidade a campo, o presente estudo teve por objetivo avaliar diversas características seminais *in vitro*, bem como a fertilidade *in vivo*, de diferentes touros utilizados em um programa de IATF, e identificar o grupo de variáveis espermáticas consideradas importantes na predição da taxa de concepção.

2. Material e Métodos

2.1. Avaliação da fertilidade a campo

2.1.1. Animais

Para este experimento, utilizaram-se os dados de 191 IATFs realizadas em vacas pluríparas lactantes, da raça Nelore, localizadas em uma fazenda comercial no

estado do Mato Grosso. Os animais foram mantidos em pasto composto por *Brachiaria brizantha* ou *Brachiaria decumbens*, suplementados com sal mineral e livre acesso à água. As vacas apresentavam ECC entre 1,75 e 3,25, na escala de 1 a 5 (onde 1 = muito magra e 5 = obesa). Todas as vacas receberam o mesmo protocolo de IATF, iniciado por volta dos 30 dias pós-parto para primeiro serviço.

2.1.2. Delineamento do experimento a campo

Doses congeladas de sêmen de três diferentes touros Angus oriundas da mesma empresa e diluídas no mesmo meio a base de leite foram usadas neste estudo. Três partidas de cada touro (n = 9) foram utilizadas.

Utilizou-se o protocolo de descongelamento do sêmen de acordo com a rotina da fazenda onde o experimento foi realizado: dez palhetas de sêmen de 0,5 mL (oriundas da mesma partida) foram descongeladas simultaneamente, em banho-maria termostaticamente controlado (descongelador elétrico de sêmen; Fertilize[®]), a 36°C, por 30 segundos, sendo utilizada uma palheta para cada vaca na IATF. Trinta segundos após a inserção das dez palhetas de sêmen no descongelador elétrico, uma palheta era aleatoriamente retirada (Palheta1-IA) do banho-maria para que a primeira inseminação fosse realizada. Depois de concluída a IA com a primeira palheta (Palheta1-IA), uma segunda palheta era utilizada em sequência (Palheta2-IA). Dessa mesma forma, as demais palhetas foram retiradas do descongelador e utilizadas em sequência, até que a décima IA (Palheta10-IA) fosse utilizada.

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal 40 dias após IATF. Para o cálculo da taxa de concepção (número de vacas gestantes

em relação ao número de vacas inseminadas), as vacas foram separadas pela sequência de inseminação.

De acordo com o experimento a campo, o tempo médio entre o momento em que as dez palhetas foram colocadas no descongelador até a remoção da décima palheta para IA foi 6 minutos e 29 segundos.

2.2. Avaliação laboratorial da qualidade seminal – experimento laboratorial

2.2.1. Delineamento do experimento laboratorial

Doses de sêmen congeladas das três partidas dos três touros Angus (n = 9) utilizadas no experimento a campo foram avaliadas no laboratório.

Com o objetivo de simular o procedimento de descongelamento seminal realizado no experimento a campo, dez palhetas de sêmen de 0,5 mL da mesma partida foram descongeladas simultaneamente, em banho-maria elétrico idêntico ao utilizado no experimento de campo, na temperatura de 36°C, por 30 segundos.

Assim, após 30 segundos, duas palhetas eram retiradas do descongelador (Palheta1-Lab) enquanto as demais palhetas permaneciam no mesmo. Para avaliar a qualidade seminal da Palheta1-Lab, depositou-se o sêmen em microtubo e diversas características espermáticas foram analisadas *in vitro*. Seis minutos e 29 segundos após, duas outras palhetas foram retiradas do descongelador para avaliar a qualidade seminal da Palheta10-Lab. O sêmen oriundo dessas duas palhetas foi depositado em microtubo e as mesmas características espermáticas foram analisadas. Na figura 1 observa-se o esquema do delineamento do experimento laboratorial.

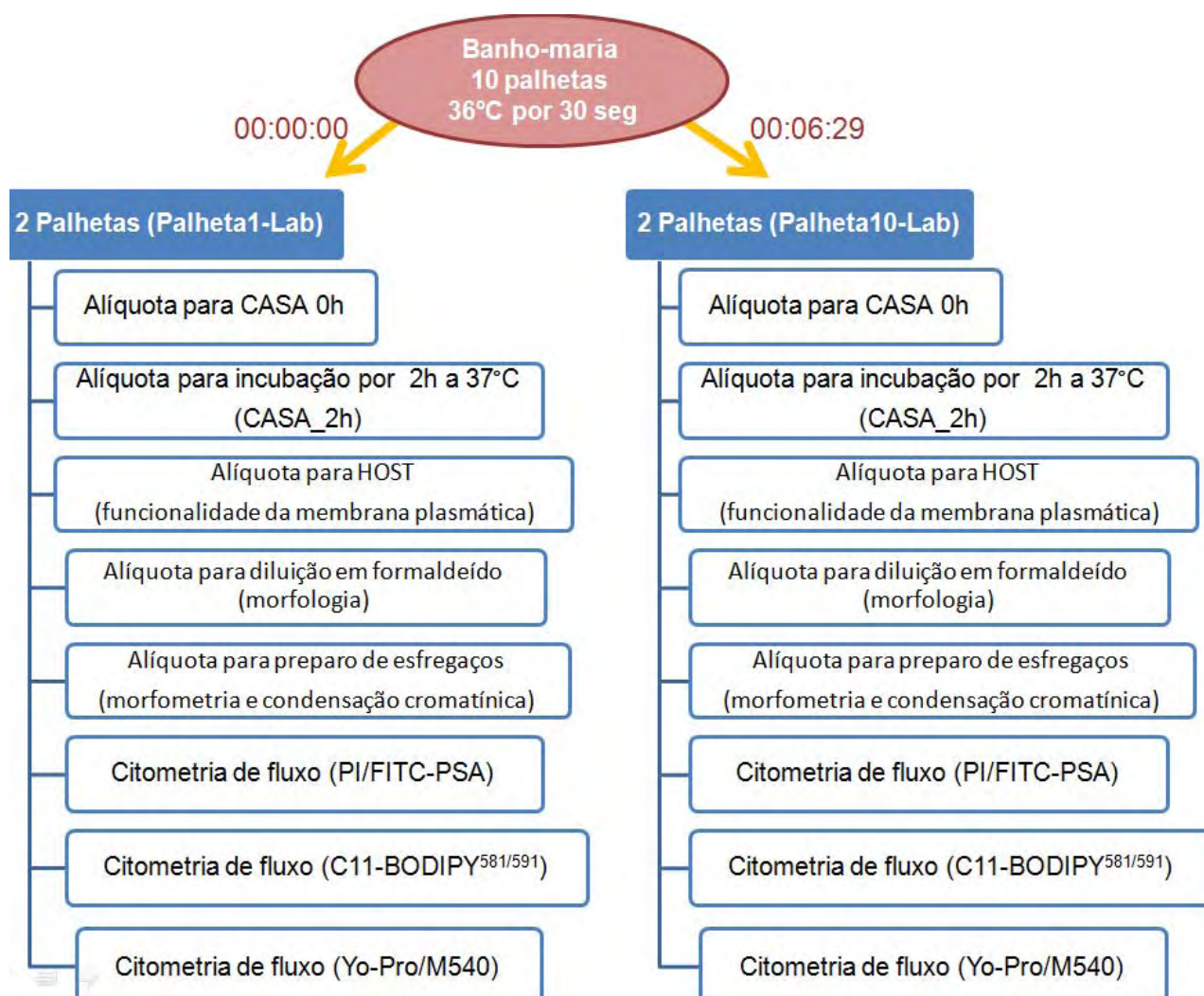


Figura 1. Delineamento do experimento laboratorial.

2.2.2. Avaliação computadorizada da motilidade espermática

A avaliação computadorizada da motilidade espermática foi realizada utilizando-se o sistema CASA (Ivos-Ultimate[®]; Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, EUA). Com o intuito de melhorar a visualização dos espermatozoides no meio diluidor a base de leite, as células espermáticas foram coradas com o H342

(Molecular Probes Inc., Eugene, EUA), tornando-se fluorescentes quando luz ultravioleta é incidida sobre elas.

O sistema CASA foi pré-ajustado para a configuração "BOVINO" (CELEGHINI et al., 2008) na opção "IDENT". Para avaliação computadorizada do movimento espermático, uma alíquota de 100 μ L de sêmen descongelado foi depositado em microtubo, e 2 μ L de H342 (5 mg/mL) foi adicionado. Essa solução foi incubada a 37°C por 20 minutos. Após incubação, a motilidade espermática foi avaliada depositando-se 6 μ L do sêmen corado com H342 em lâmina de leitura padrão (Makler counting chamber, SEFI Medical Instruments LTD, Haifa, Israel) previamente aquecida a 37°C, a qual foi inserida no aparelho Hamilton Thorne do sistema CASA. Seis campos foram aleatoriamente selecionados para cada amostra. As variáveis da cinética espermática analisadas pelo CASA foram: Motilidade Total (MT; %), Motilidade Progressiva (PM; %), Velocidade de Trajeto (VAP; μ m/s), Velocidade Progressiva (VSL; μ m/s), Velocidade Curvilínea (VCL; μ m/s), Amplitude Lateral da Cabeça (ALH; μ m), Frequência de Batimentos (BCF; Hz), Retilinearidade (STR; %), Linearidade (LIN; %) e Células com Velocidade Rápida (RAPID; %).

2.2.3. Avaliação da termo-resistência espermática após 2 horas de incubação

A análise de termo-resistência espermática após 2 horas de incubação foi realizada com o objetivo de se avaliar um teste alternativo para verificar a longevidade espermática das amostras seminais pós-descongelamento. Assim, imediatamente após a palheta ser removida do descongelador, uma alíquota de 250 μ L do sêmen descongelado foi colocada em microtubo pré-aquecido que ficou

incubado a 37°C durante 2 horas. Após 120 minutos (2h), as amostras foram avaliadas pelo CASA, realizando-se o mesmo procedimento descrito na seção 2.2.2. As seguintes variáveis foram avaliadas: TM_2h, PM_2h, VAP_2h, VSL_2h, VCL_2h, ALH_2h, BCF_2h, STR_2h, LIN_2h, RAPID_2h.

2.2.4. *Teste Hipo-osmótico (HOST)*

O HOST foi realizado depositando-se 20 uL de sêmen em 1 mL de solução hipo-osmótica (100 mOsm; REVELL & MRODE, 1994) a 37°C durante 60 minutos. Após esse período, uma alíquota de 20 uL do sêmen diluído na solução hipo-osmótica foi colocada entre lâmina e lamínula e avaliada por microscopia de contraste de fase. Duzentos espermatozoides foram avaliados em aumento de 1000X. A porcentagem de espermatozoides viáveis (células HOST +) foi calculada de acordo com REVELL & MRODE (1994).

2.2.5. *Avaliação simultânea das membranas plasmática e acrossomal*

Para avaliar as células com membranas plasmática e acrossomal intactas, uma alíquota de sêmen foi retirada das amostras e adicionado meio TALPm, de modo que as amostras resultantes apresentavam concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL em volume de 148 uL. Em seguida, 2 uL de H342 (40 ug/mL) foi adicionado para que o DNA das células fossem corados, de modo que apenas espermatozoides fossem considerados. Após 10 minutos de incubação a 37°C, 3 uL de iodeto de propídio (PI; 0,5 mg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 10 uL de aglutinina de *Pisum Sativum* conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 ug/mL; Sigma-Aldrich) foram adicionados às amostras (CELEGHINI et

al., 2007). Após 10 minutos de incubação a 37°C, com a adição de 150 uL de TALPm, as amostras foram diluídas na concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL para serem então analisadas por citometria de fluxo (De ANDRADE et al., 2011).

A associação das sondas fluorescentes FITC-PSA gerou quatro populações de células: AIMI = espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas; AIML = espermatozoides com membrana plasmática lesionada e membrana acrossomal intacta; ALMI = espermatozoides com membrana plasmática intacta e membrana acrossomal lesionada; ALML = espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal lesionadas (LEITE et al., 2010).

A porcentagem de espermatozoides apresentando membrana plasmática intacta (MPI: AIMI + ALMI), a porcentagem de espermatozoides apresentando acrossoma intacto (Aci: AIMI + AIML), bem como a subpopulação AIMI foram consideradas para as análises estatísticas.

2.2.6. Avaliação da estabilidade da membrana plasmática

Para avaliação da estabilidade da membrana plasmática por citometria de fluxo (RATHI et al., 2001), as amostras foram diluídas em TALPm na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL, em volume final de 147 μ L. Em seguida, foram adicionados 2 μ L de H342 (40 μ g/mL) e incubados por 10 minutos (37°C). Em seguida, 0,5 μ L da sonda fluorescente Yo-Pro-1 (Y3603, Molecular Probes Inc., Eugene, EUA) foi adicionada à amostra (7,5 μ M), resultando em concentração final de 25 nM. Posteriormente, a amostra foi incubada por 20 minutos. Por fim, a sonda fluorescente merocianina 540 (M540; M24571, 810 μ M, Molecular Probes

Inc., Eugene, EUA) foi adicionada na concentração de 2,7 μM em 150 μL , sendo esta incubada por 70 segundos. As amostras foram então diluídas em 150 μL de TALPm e analisadas por citometria de fluxo.

O Yo-Pro-1 é uma sonda fluorescente impermeável à membrana plasmática intacta, só se incorporando ao DNA de células com membrana plasmática danificada. Assim, a coloração das amostras pelas sondas Yo-Pro/M540 gerou três categorias de células: células Yo-Pro positivas = espermatozoide com membrana plasmática lesionada (Yo-Pro+); MIBD = espermatozoide com membrana plasmática íntegra (Yo-Pro negativas) e baixo grau de desorganização da bicamada lipídica (baixa emissão de fluorescência, consideradas não capacitadas); MIAD = espermatozoide com membrana plasmática íntegra (Yo-Pro negativas) e alto grau de desorganização da bicamada lipídica (alta emissão de fluorescência; consideradas capacitadas); (ZAFFALON, 2009). As células Yo-Pro+, MIAD e MIBD foram consideradas para as análises estatísticas.

2.2.7. Avaliação da peroxidação lipídica

Para avaliação da peroxidação lipídica, retirou-se uma alíquota das amostras seminais e adicionou-se TALPm a fim de se obter amostras com 5×10^6 espermatozoides/mL, no volume final de 499,5 μL . Em seguida, a sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591} (1mg/mL, D-3861, Molecular Probes Inc., Eugene, EUA) foi adicionada. Essa amostra foi incubada durante 30 minutos a 37°C. Após este período de incubação, 145 μL desta solução foi transferida para outro microtubo e adicionou-se 2 μL de H342 (40 $\mu\text{g/mL}$). Esta amostra foi então incubada durante 10 minutos a 37°C. A sonda H342 foi adicionada para evitar que

outras partículas com mesmo tamanho que as células espermáticas fossem incluídas na contagem. Assim, após incubação com H342, 3 uL de PI (0,5mg/mL) foram adicionados à amostra para que as células com membrana plasmática lesionada fossem identificadas. A amostra foi então incubada com PI durante 5 minutos a 37°C. Por fim, a amostra foi diluída com TALPm na concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL para ser analisada por citometria de fluxo.

A coloração das amostras pela sonda C11-BODIPY^{581/591} gerou quatro populações de células: MINP = espermatozoides com membrana plasmática íntegra e reduzida peroxidação lipídica; MIP = espermatozoides com membrana plasmática íntegra e elevada peroxidação lipídica; MLNP = espermatozoides com membrana plasmática lesionada e reduzida peroxidação lipídica; MLP = espermatozoides com membrana plasmática lesionada e elevada peroxidação lipídica (ZAFFALON, 2009). As variáveis MIP e MINP foram consideradas para as análises estatísticas.

2.2.8. Avaliação da morfologia espermática

Para avaliar a morfologia espermática, as amostras de sêmen foram diluídas e fixadas em formaldeído-PBS pré-aquecido (37°C). As células espermáticas (n = 200) foram avaliadas por microscopia de contraste de interferência diferencial (modelo 80i; Nikon, Tokyo, Japan) com aumento de 1000X. As características morfológicas dos espermatozoides foram classificadas como defeitos maiores e defeitos menores, de acordo com BLOM (1973).

2.2.9. Avaliação da estrutura cromatínica e morfometria espermática

Para avaliação da estrutura cromatínica e morfometria espermática, dois esfregaços foram preparados para cada amostra. Os esfregaços foram fixadas com etanol e ácido acético (3:1, V/V) durante 1 minuto e etanol 70% durante 3 minutos. Em seguida, os esfregaços foram imergidos em solução de hidrólise (HCL 4M) por 25 minutos, lavados em água destilada e secos em temperatura ambiente. Uma gota de Azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine (pH 4,0), foi colocada sobre cada esfregaço e, em seguida, coberta com lamínula.

Para cada lâmina de esfregaço, cinquenta imagens digitais em tons de cinza foram obtidas aleatoriamente utilizando-se microscópio Leica DM500 (Leica Microsystems Inc., BuffaloGrove, EUA) com lente objetiva de 1000X acoplada à câmara Leica ICC50 (Leica Microsystems Inc., BuffaloGrove, EUA), conectada a um microcomputador. O limiar de segmentação de imagens foi baseado nos estudos de BELETTI & COSTA (2003). Seis cabeças com os menores valores de pixel foram automaticamente selecionadas e definidas como cabeças-padrão (teoricamente, as cabeças com cromatina mais condensada). Em seguida, a diferença entre o valor padrão do esfregaço e o valor médio de cada cabeça foi transformada em porcentagem (Dif), que indica a descondensação cromatínica. Calculou-se ainda o coeficiente de variação (CV) da intensidade da escala de cinza para cada cabeça, que indica a heterogeneidade da cromatina. Área, perímetro, largura, comprimento, razão largura:comprimento, elipticidade e fator forma de todas as cabeças espermáticas foram determinados. Descritores Fourier contendo amplitudes harmónicas de 0 a 2 (Fourier 0, 1 e 2) também foram considerados, assim como a simetria lateral e a simetria antero-posterior da

cabeça espermática, que identifica assimetrias ao longo do eixo principal do espermatozoide (BELETTI et al., 2005a; KANAYAMA & BELETTI, 2011).

2.2.10. Avaliação da concentração espermática

Para mensuração da concentração, adicionou-se 20 μ L de sêmen descongelado em 980 μ L de Formol Salina Tamponada e a concentração espermática foi determinada contando os espermatozoides, com o emprego da câmara de Neubauer, sob microscopia óptica comum com aumento de 400X.

2.3. Análise estatística

Neste estudo, utilizou-se o método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS, do inglês "*Partial Least Squares*") para explorar a importância das variáveis seminais na predição da taxa de concepção. A regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), que foi proposta inicialmente por Wold (1994), é uma técnica de análise de dados multivariados utilizada para relacionar uma (ou mais) variável resposta (taxa de concepção, neste caso) com diversas variáveis independentes (características espermáticas *in vitro*), baseadas no uso de fatores.

A análise PLS foi realizada separadamente por palheta (Palheta1 ou Palheta10) utilizando o programa SAS (versão 9,2). A taxa de concepção consistiu nos dados utilizados como "resposta" para análise PLS. Para taxa de concepção desse estudo, utilizaram-se somente os dados das vacas inseminadas com as primeiras (Palheta1-IA; n = 97) e últimas (Palheta10-IA; n = 94) palhetas da sequência. Assim, as variáveis obtidas nas análises da Palheta1-Lab foram

analisadas com os resultados de Palheta1-AI, e os resultados das variáveis da Palheta10-Lab foram analisadas com os resultados de Palheta10-IA.

Em cada ensaio estatístico, um coeficiente de predição e um valor de importância da variável ("*variable importance*") foram obtidos para cada variável espermática quando os resultados laboratoriais foram confrontados com os resultados de campo. Os coeficientes de predição representam a importância que cada preditor tem na resposta (taxa de concepção). Este valor indica o quanto o fator explica a variação da resposta. O valor de importância da variável, por outro lado, representa a contribuição de cada preditor em ajustar o modelo para preditores e resposta. Estes se baseiam na importância da variável para projeção estatística (VIP) de WOLD (1994), que sumariza a contribuição que uma variável tem sobre o modelo. Se um preditor tem um coeficiente relativamente baixo (em valor absoluto) e um pequeno valor de VIP, então é um excelente candidato para exclusão. Wold em Umetrics (SAS, 2001) considera um valor inferior a 0,8 como "baixo" para VIP.

No presente experimento, optou-se por realizar a análise PLS por várias vezes consecutivas, excluindo as variáveis com valor de VIP inferior a 0,8, até que nenhuma variável restante apresentasse $VIP < 0,8$. Este procedimento teve o intuito de reduzir o número de variáveis selecionadas como os melhores preditores da fertilidade a campo.

Para a análise dos resultados da Palheta1 (variáveis de Palheta1-Lab e taxa de concepção de Palheta1-IA), o seguinte procedimento foi realizado: após a primeira análise PLS contendo todas as variáveis, os preditores com $VIP < 0,8$ foram excluídos. Em seguida, a análise PLS foi realizada pela segunda vez (sem

as variáveis que foram previamente excluídas). Novamente, os preditores com VIP < 0,8 foram excluídos. Em seguida, a PLS foi realizada pela terceira vez (sem as variáveis previamente excluídas), até que todas as variáveis apresentassem VIP ≥ 0,8. Deste modo, as variáveis remanescentes foram selecionadas como os melhores preditores da taxa de concepção, dentre as variáveis avaliadas.

Para análise dos resultados da Palheta10 (variáveis de Palheta10-Lab e taxa de concepção de Palheta10-IA), realizou-se o mesmo procedimento.

3. Resultados

Como relatado anteriormente, análises PLS foram utilizadas para explorar a importância das variáveis espermáticas na predição da taxa de concepção. Os fatores PLS foram avaliados para cada característica espermática *in vitro* em função da fertilidade seminal *in vivo*. As variáveis foram selecionadas de acordo com o critério de WOLD (Wold's criterion, 1994; SAS, 2001) Portanto, o valor de corte da "importância da variável para projeção" foi VIP < 0,8.

Visto que as análises para Palheta1 e para Palheta10 foram realizadas independentemente, os resultados encontram-se apresentados separadamente.

3.1. Resultados de PLS para Palheta 1

A taxa média de concepção na IATF de vacas inseminadas com a palheta 1 (Palheta1-IA) foi de 57,73% (56/97).

A Figura 2 demonstra o gráfico de importância das variáveis obtido no primeiro procedimento PLS para a palheta 1.

Gráfico de Importância das Variáveis

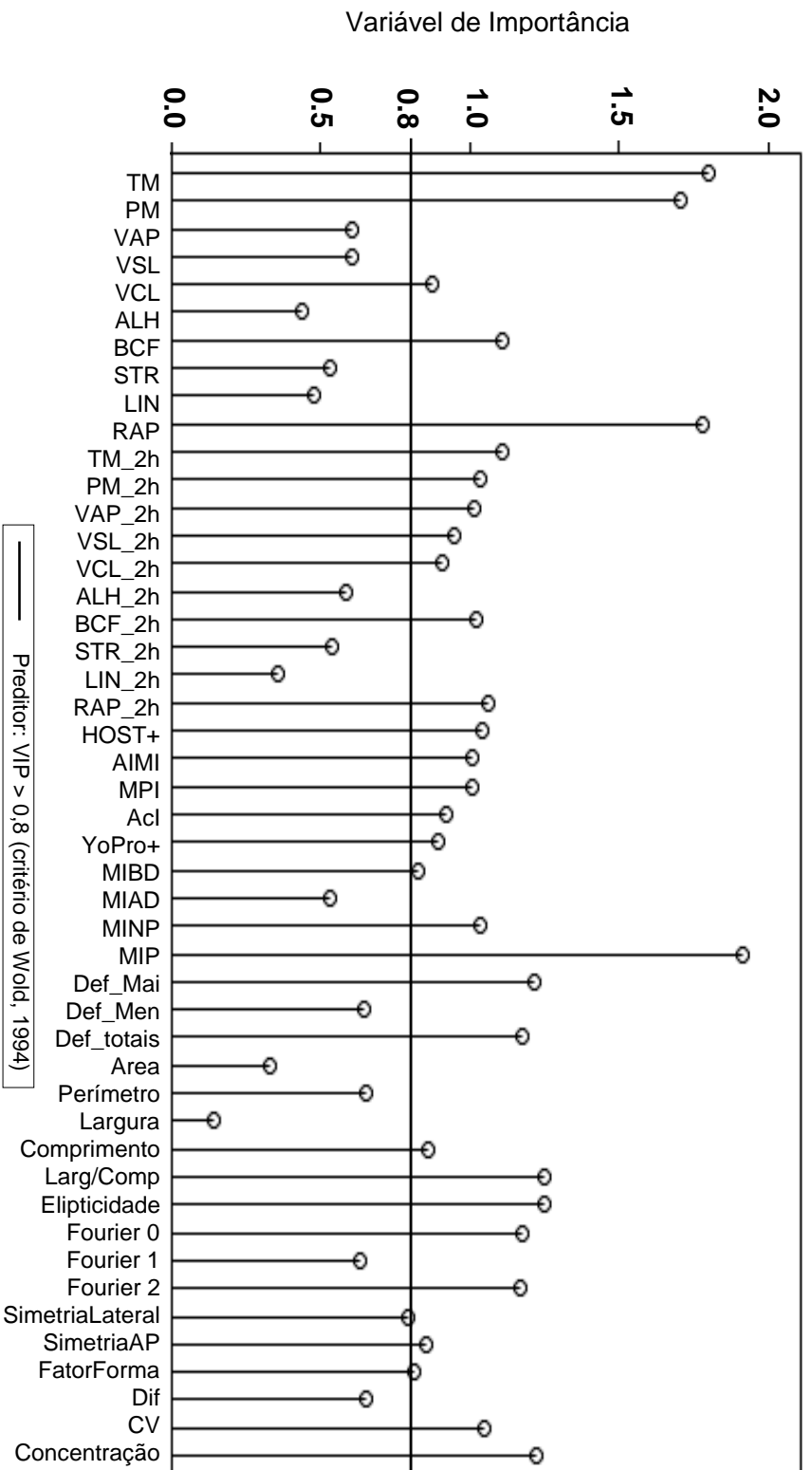


Figura 2. Gráfico de importância das variáveis do primeiro procedimento PLS com resultados da palheta 1. O valor de corte da importância da variável para projeção (VIP < 0,8) foi determinada de acordo com WOLD (1994; SAS, 2001); TM: Motilidade Total; PM: Motilidade Progressiva; VAP: Velocidade de trajeto; VSL: Velocidade retilínea; VCL: Velocidade curvilínea; ALH: Amplitude do deslocamento lateral; BCF: Frequência de batimentos; STR: Retililinearidade; LIN: Linearidade; RAP: Porcentagem de células rápidas; HOST+: células viáveis; AIMI: membranas plasmática e acrossomal íntegras; MPI: total de células com membrana plasmática íntegra; Acl: total de células com membrana acrossomal íntegra; YoPro: membrana plasmática lesionada; MIBD: membrana plasmática íntegra não capacitadas; MIAD: membrana plasmática íntegra capacitadas; MINP: membrana plasmática íntegra não peroxidadas; MIP: membrana plasmática íntegra peroxidadas; Larg/comp: razão largura:comprimento; Simet AP: simetria Antero-Posterior; Dif: condensação cromatínica; CV: heterogeneidade cromatínica.

Após o primeiro procedimento PLS da palheta 1 (Figura 2), as seguintes variáveis apresentaram $VIP < 0,8$ e foram excluídas: VAP, VSL, ALH, STR, LIN, ALH_2h, STR_2h, LIN_2h, MIAD, defeitos menores, área, perímetro, largura, Fourier 1, simetria lateral e Dif. Em seguida, o procedimento PLS foi realizado pela segunda vez com as variáveis remanescentes.

A Figura 3 demonstra o gráfico obtido no segundo procedimento PLS para a palheta 1.

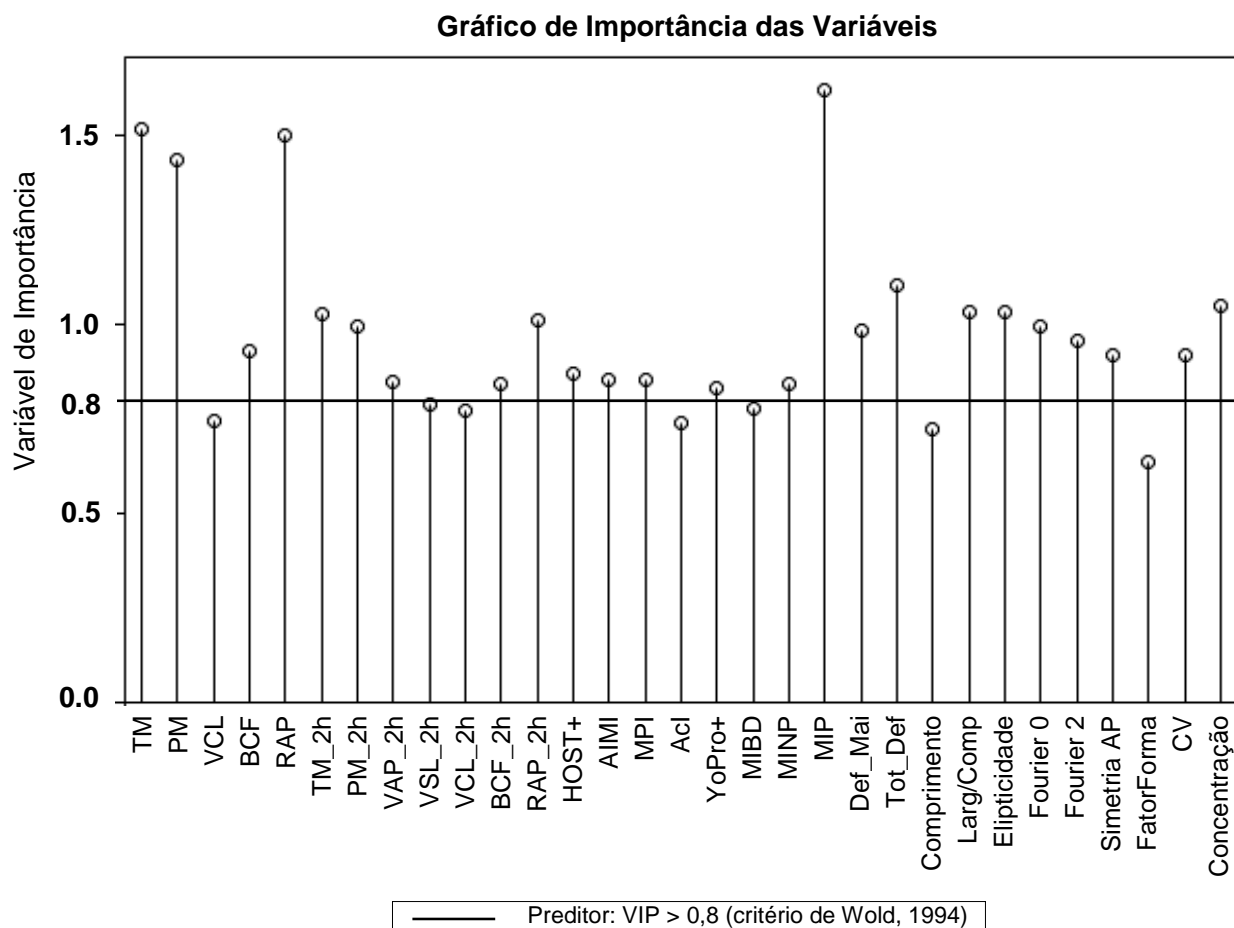


Figura 3. Gráfico de importância das variáveis do segundo procedimento PLS com resultados da palheta 1. O valor de corte da importância da variável para projeção ($VIP < 0,8$) foi determinada de acordo com WOLD (1994).

Após o segundo procedimento PLS (Figura 3), as seguintes variáveis apresentaram $VIP < 0,8$ e foram excluídas: VCL, VSL_2h, VCL_2h, Acl, MIBD e comprimento e fator forma. Além disso, a variável elipticidade foi excluída, pois representa a mesma variável espermática que razão largura:comprimento. Adicionalmente, a variável YoPro+ foi excluída pois representa uma característica espermática muito semelhante à característica MPI. Em seguida, o procedimento PLS foi realizado pela terceira vez com as variáveis remanescentes. A Figura 4 demonstra o gráfico obtido no terceiro procedimento PLS para a palheta 1.

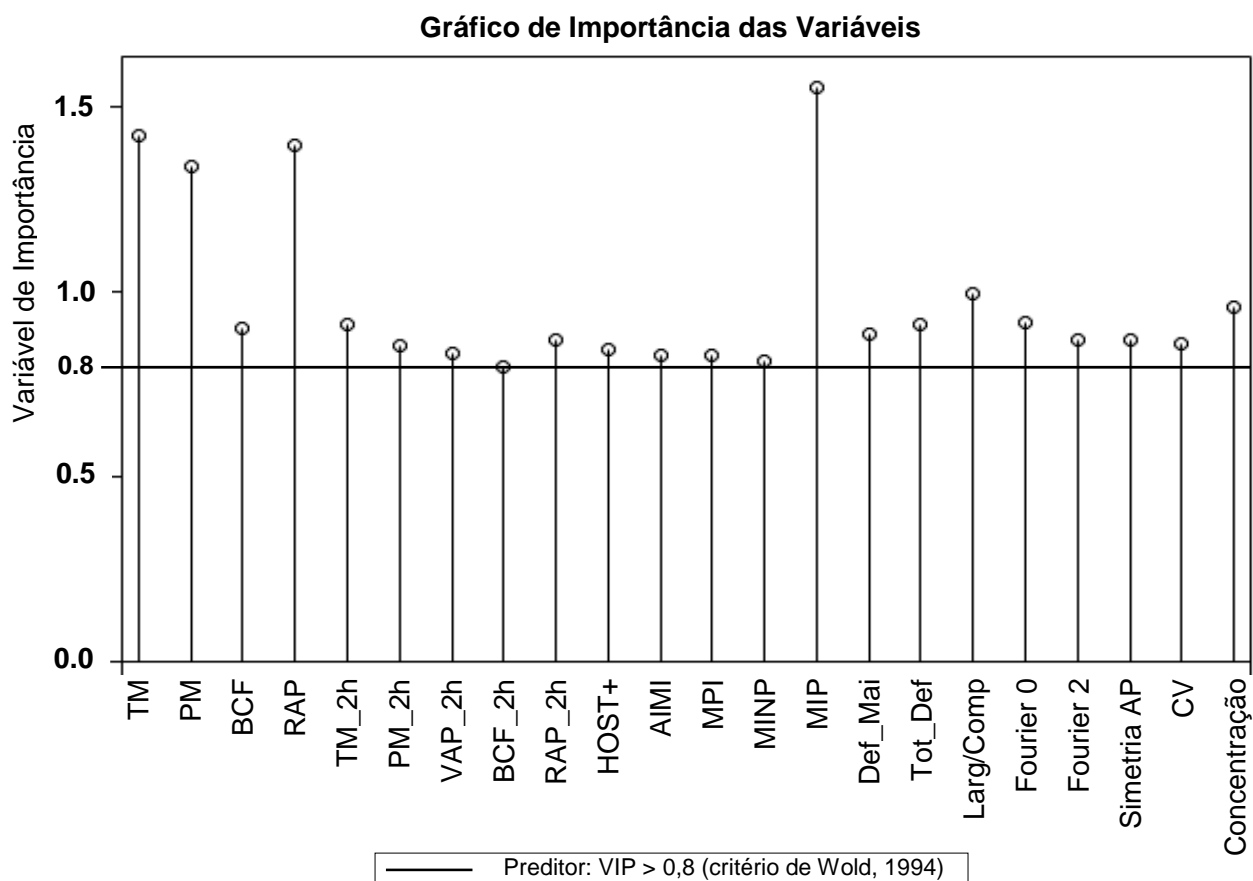


Figura 4. Gráfico de importância das variáveis do terceiro procedimento PLS com resultados da palheta 1. O valor de corte da importância da variável para projeção ($VIP < 0,8$) foi determinada de acordo com WOLD (1994).

Após o terceiro procedimento PLS (Figura 4), nenhuma outra variável apresentou $VIP < 0,8$.

Portanto, as seguintes variáveis foram consideradas importantes para a predição da taxa de concepção: TM, PM, BCF, RAP, TM_2h, PM_2h, VAP_2h, BCF_2h, RAP_2h, células + HOST, AIMI, MPI, MINP, MIP, defeitos maiores, total de defeitos, razão largura:comprimento, Fourier 0, Fourier 2, simetria Antero-posterior, heterogeneidade cromatínica e concentração espermática.

3.2. Resultados de PLS para Palheta 10

A taxa média de concepção na IATF de vacas inseminadas com a palheta 10 (Palheta10-IA) foi de 43,62% (41/94).

A Figura 5 demonstra o gráfico de importância das variáveis obtido no primeiro procedimento PLS para a palheta 10.

Após o primeiro procedimento PLS da palheta 10 (Figura 5), as seguintes variáveis apresentaram $VIP < 0,8$ e foram excluídos: PM, BCF, VAP_2h, VSL_2h, VCL_2h, área, perímetro, comprimento, Fourier 0, Fourier 1, Fourier 2, simetria lateral, simetria Antero-posterior, fator forma.

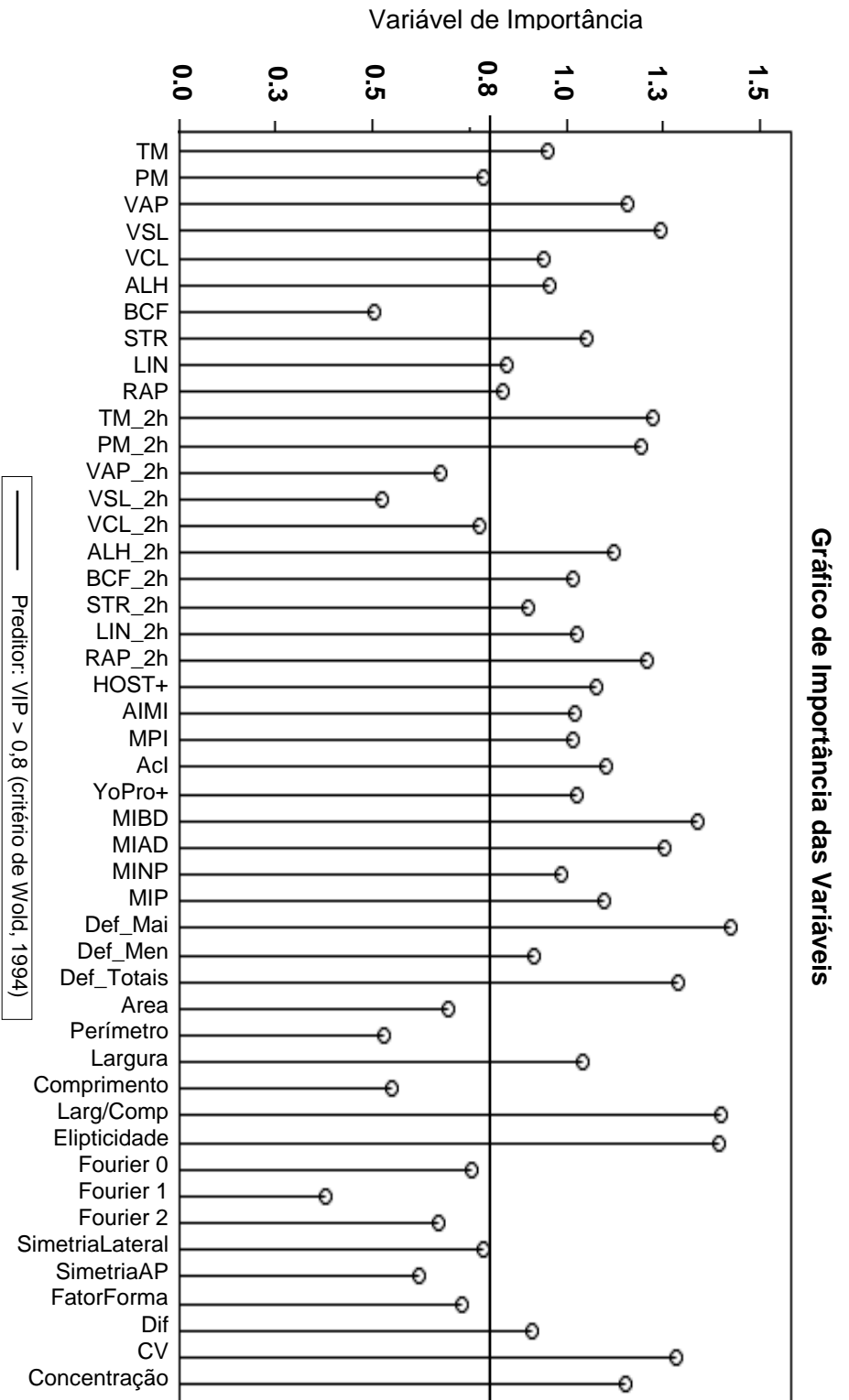


Figura 5. Gráfico de importância das variáveis do primeiro procedimento PLS com resultados da palheta 10. O valor de corte da importância da variável para projeção (VIP < 0,8) foi determinada de acordo com WOLD (1994; SAS, 2001); TM: Motilidade Total; PM: Motilidade Progressiva; VAP: Velocidade de trajeto; VSL: Velocidade retilínea; VCL: Velocidade curvilínea; ALH: Amplitude do deslocamento lateral; BCF: Frequência de batimentos; STR: Retilíneidade; LIN: Linearidade; RAP: Porcentagem de células rápidas; HOST+: células viáveis; AIMI: membranas plasmática e acrossomal íntegra; MPI: total de células com membrana plasmática íntegra; Acl: total de células com membrana acrossomal íntegra; YoPro: membrana plasmática lesionada; MIBD: membrana plasmática íntegra não capacitadas; MIAD: membrana plasmática íntegra capacitadas; MINP: membrana plasmática íntegra não peroxidadas; MIP: membrana plasmática íntegra peroxidadas; Larg/comp: razão largura:comprimento; Simet AP: simetria Antero-posterior; Dif: condensação cromatínica; CV: heterogeneidade cromatínica.

Em seguida, o procedimento PLS foi realizado pela segunda vez com as variáveis remanescentes. A Figura 6 demonstra o gráfico de importância das variáveis obtido no segundo procedimento PLS para a palheta 10.

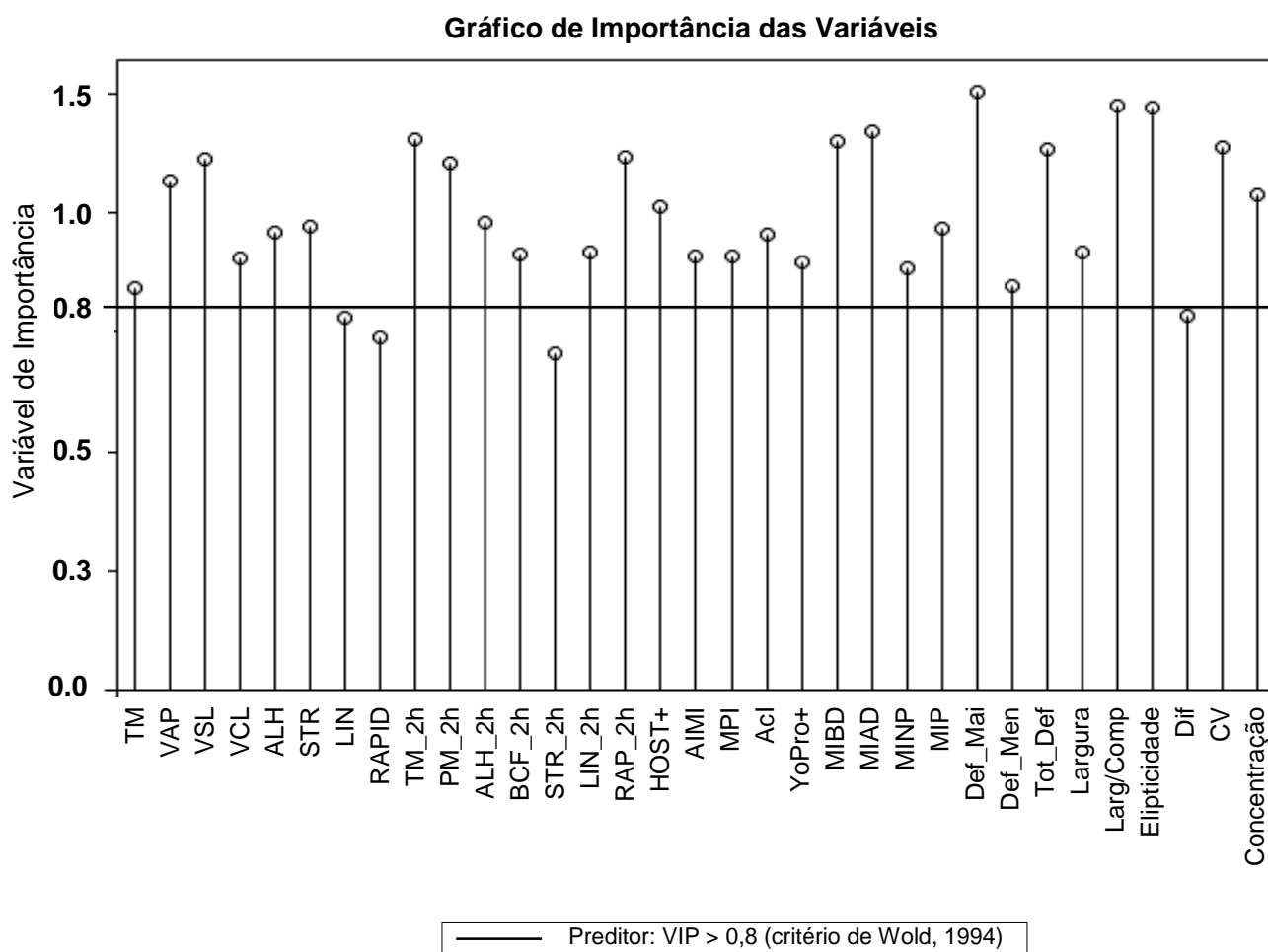


Figura 6. Gráfico de importância das variáveis do segundo procedimento PLS com resultados da palheta 10. O valor de corte da importância da variável para projeção ($VIP < 0,8$) foi determinada de acordo com WOLD (1994; SAS, 2001).

Após o segundo procedimento PLS da palheta 10 (Figura 6), as seguintes variáveis apresentaram $VIP < 0,8$ e foram excluídos: LIN, RAPID, STR_2h e Dif. Além disso, elipticidade foi excluída porque representa a mesma variável espermática que a razão largura:comprimento e a variável YoPro+ foi também excluída porque apresenta alta similaridade com a característica MPI.

Em seguida, o procedimento PLS foi realizado pela terceira vez com as variáveis remanescentes. A Figura 7 demonstra o gráfico de importância das variáveis obtido no terceiro procedimento PLS para a palheta 10.

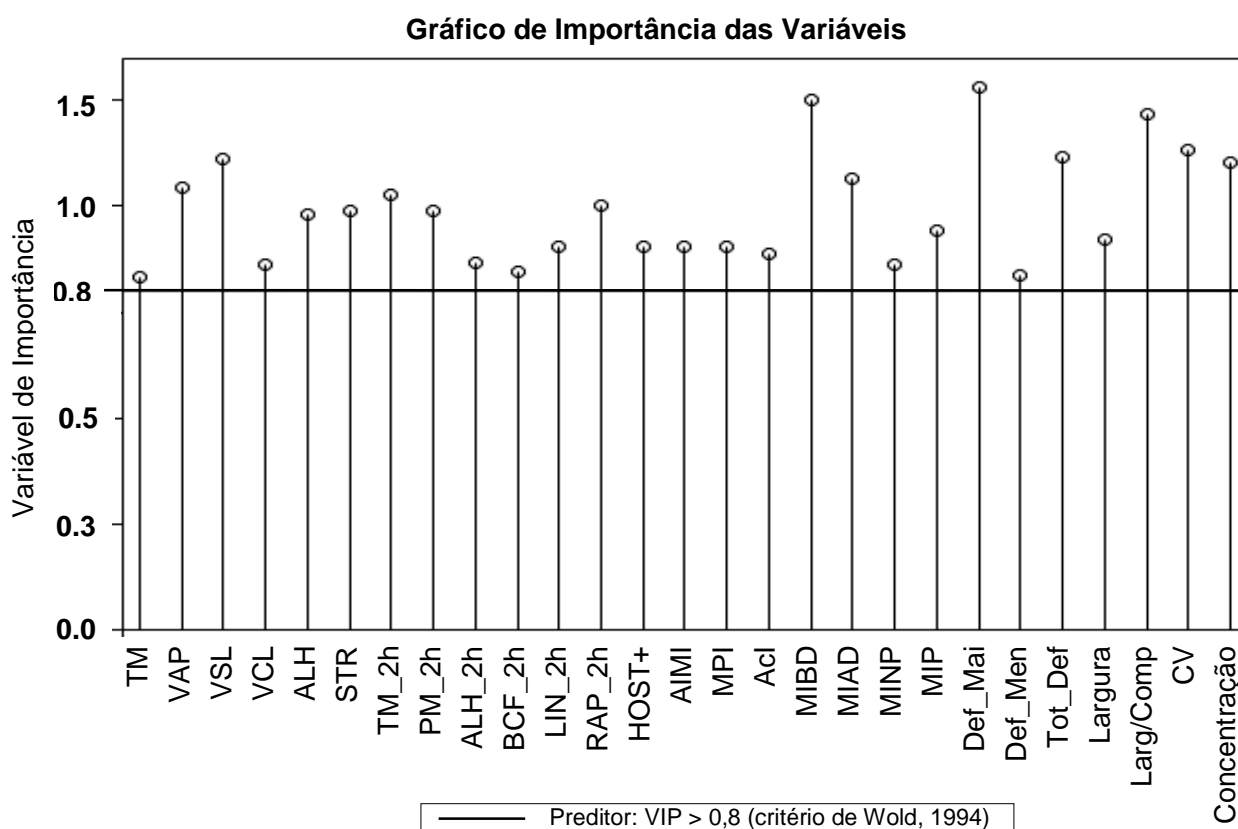


Figura 7. Gráfico de importância das variáveis do terceiro procedimento PLS com resultados da palheta 10. O valor de corte da importância da variável para projeção ($VIP < 0,8$) foi determinada de acordo com WOLD (1994; SAS, 2001).

Após o terceiro procedimento PLS realizado com os resultados das análises da palheta 10 (Figura 7), nenhuma outra variável apresentou $VIP < 0,8$.

Portanto, as seguintes variáveis foram consideradas importantes para a predição da taxa de concepção: TM, VAP, VSL, VCL, ALH, STR, TM_2h, PM_2h, ALH_2h, BCF_2h, LIN_2h, RAP_2h, células + HOST, AIMI, MPI, Acl, MIBD, MIAD, MINP, MIP, defeitos maiores, defeitos menores, total de defeitos, largura, razão largura:comprimento, heterogeneidade cromatínica e concentração espermática.

3.3. Variáveis espermáticas selecionadas como importantes preditores da taxa de concepção considerando os resultados das palhetas 1 e 10

Como descrito anteriormente, os procedimentos PLS selecionaram as variáveis espermáticas mais importantes para predição da fertilidade a campo, com os resultados das palhetas 1 e 10, baseando-se no critério de WOLD (1994).

Os gráficos de importância da variável indicaram as variáveis que apresentaram contribuição substancial para o modelo ($VIP > 0,8$), ao passo que, as variáveis com VIP inferior a 0,8 puderam ser excluídas da seleção final.

Os dados selecionados após os procedimentos PLS para palheta 1 e 10, encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de VIP (importância da variável para projeção) obtidos ao final dos procedimentos PLS com as variáveis das Palhetas 1 e 10, em resposta à predição da taxa de concepção

Variáveis	VIP	
	Palheta1	Palheta10
Motilidade Total	1,40	0,83
Motilidade Progressiva	1,38	NS
VAP	NS	1,03
VSL	NS	1,10
VCL	NS	0,85
ALH	NS	0,99
BCF	0,87	NS
STR	NS	1,00
RAPID	1,40	NS
Motilidade Total_2h	0,88	1,02
Motilidade Progressiva_2h	0,84	1,00
VAP_2h	0,83	NS
ALH_2h	NS	0,85
BCF_2h	0,80	0,84
LIN_2h	NS	0,87
RAPID_2h	0,84	1,01
Células + HOST	0,83	0,87
AIMI	0,82	0,87
MPI	0,82	0,87
Acrossoma íntegro	NS	0,86
MIBD	NS	1,25
MIAD	NS	1,05
MINP	0,81	0,85
MIP	1,60	0,90
Defeitos Maiores	0,87	1,27
Defeitos Menores	NS	0,84
Total de Defeitos	0,95	1,10
Largura	NS	0,88
Largura/Comprimento	1,00	1,23
Fourier_0	0,95	NS
Fourier_2	0,85	NS
Simetria Antero-posterior	0,85	NS
CV	0,85	1,13
Concentração	0,97	1,10

PLS: método de mínimos quadrados parciais; NS: variável não selecionada; VAP: Velocidade de trajeto; VSL: Velocidade retilínea; VCL: Velocidade curvilínea; ALH: Amplitude do deslocamento lateral; BCF: Frequência de batimentos; STR: Retilinearidade; LIN: Linearidade; RAP: Porcentagem de células rápidas; VAP_2h: VAP após 2h; VSL_2h: VSL após 2h; VCL_2h: VCL após 2h; ALH_2h: ALH após 2h; BCF_2h: BCF após 2h; STR_2h: STR após 2h; células + HOST: células com membrana funcional após teste hiposmótico; AIMI: células com membranas plasmática e acrossomal íntegras; MPI: total de células com membrana plasmática íntegra; MIBD: células com membrana plasmática íntegra não capacitadas; MIAD: células com membrana plasmática íntegra capacitadas; MINP: células com membrana plasmática íntegra não peroxidadas; MIP: células com membrana plasmática íntegra peroxidadas; CV: heterogeneidade cromatínica.

Assim sendo, como pode ser observado na Tabela 1, reunindo-se os resultados de ambos os ensaios (Palhetas 1 e 10), as seguintes variáveis espermáticas foram consideradas importantes para predizer a taxa de concepção: TM, PM, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, RAP, TM_2h, PM_2h, VAP_2h, ALH_2h, BCF_2h, LIN_2h, RAP_2h, HOST+, AIMI, MPI, Acl, MIBD, MIAD, MINP, MIP, defeitos maiores, defeitos menores, defeitos totais, largura, razão largura:comprimento, Fourier 0, Fourier 2, Simetria Antero-posterior, heterogeneidade cromatínica e concentração espermática.

Entretanto, algumas dessas variáveis selecionadas pelos procedimentos PLS representam as mesmas características espermáticas e/ou são muito similares entre si. Portanto, baseando-se na literatura e/ou conhecimento científico, elegeu-se um grupo de 21 variáveis dentre estas variáveis previamente selecionadas pelo critério de WOLD (1994). Deste modo, no presente estudo, as seguintes variáveis foram selecionadas como importantes preditores da fertilidade a campo: TM, PM, VAP, BCF, RAP, TM_2h, PM_2h, VAP_2h, BCF_2h, RAP_2h, HOST+, AIMI, MIAD, MIP, defeitos maiores, total de defeitos, razão largura:comprimento, Fourier 0, Fourier 2, heterogeneidade cromatínica e concentração espermática.

4. Discussão

No presente estudo, a qualidade do sêmen foi avaliada utilizando-se clássicos e modernos testes laboratoriais. Em seguida, a análise estatística PLS foi realizada e um grupo de variáveis consideradas importantes na predição da

taxa de concepção foi identificado. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a utilizar o método PLS para explorar a importância da relação entre diversas características espermáticas *in vitro* e a fertilidade *in vivo* de diferentes touros utilizados no mesmo programa de IATF.

Segundo SUDANO et al. (2011), a competência de um teste laboratorial em prever a fertilidade do touro pode estar diretamente relacionada com a análise estatística realizada. No presente experimento, optou-se pela análise estatística PLS porque alguns problemas complexos em diversas áreas podem ser resolvidos usando-se este método, incluindo o conjunto limitado de dados que são frequentemente observados em experimentos biológicos.

Diversos fatores inerentes à qualidade seminal podem influenciar o sucesso dos programas de inseminação (SÁ FILHO et al., 2009). Assim, aumentando-se o número de vacas inseminadas, aumenta-se a acurácia dos resultados referentes à fertilidade do touro, pois se diminui a influência de fatores relativos à fêmea nos resultados de fertilidade a campo. Portanto, com o intuito de se obter taxas de concepção mais precisas para cada touro, optou-se por inseminar elevado número de vacas para cada partida de sêmen, o que, infelizmente, acarretou na impossibilidade da utilização de um grande número de reprodutores no presente experimento.

Ressalta-se, entretanto, que os métodos PLS podem ser utilizados para analisar os dados de múltiplas variáveis coletadas sobre as mesmas observações (KRISHNAN et al., 2011). Por exemplo, os métodos de PLS têm se demonstrado adequados para a análise das relações entre as medidas da atividade cerebral e o comportamento de seres humanos (KRISHNAN et al., 2011). Assim, utilizando-se

essa análise estatística foi possível investigar as relações entre as características espermáticas laboratoriais e a fertilidade a campo, mesmo com poucas repetições para cada touro e reduzido número de touros e partidas seminais do estudo.

Em relação às análises espermáticas, é interessante notar que ambos testes relativos à motilidade (CASA avaliado após 0 e 2h de incubação térmica) forneceram variáveis espermáticas que foram selecionadas como importantes preditores de fertilidade a campo (MT, MP, VAP, BCF, VAP, TM_2h, PM_2h, VAP_2h, BCF_2h, RAP_2h). Neste sentido, FARRELL et al. (1998) demonstraram que as combinações de diversas variáveis do CASA apresentaram maiores correlações com a fertilidade do touro do que os parâmetros individuais. Os autores observaram que a combinação de PM, ALH, BCF e VAP apresentou alta correlação com a fertilidade a campo ($r^2 = 0,87$). Quando mais variáveis foram incluídas no modelo, como a combinação de ALH, BCF, LIN, VAP e VSL, um valor de correlação ainda mais alto ($r^2 = 0,98$) foi observado (FARRELL et al., 1998). Assim, no presente experimento, ratificou-se que as avaliações de motilidade computadorizada são importantes para a avaliação da qualidade seminal, principalmente considerando-se que o sistema CASA permite avaliar simultaneamente múltiplas características do movimento espermático com alta repetibilidade (FARRELL et al., 1998; VERSTEGEN et al., 2002). Ainda, de acordo com os resultados aqui apresentados, a longevidade espermática pós-descongelamento (avaliada pela termo-resistência espermática após 2 horas de incubação), parece oferecer importantes preditores da fertilidade *in vivo*.

Resultados importantes também foram obtidos com as avaliações de membranas espermáticas do presente estudo. A funcionalidade da membrana

plasmática aferida pelo teste hipo-osmótico (células + HOST), a integridade da membrana plasmática avaliada pela sonda PI e também a integridade da membrana acrossomal avaliada pela sonda FITC-PSA (células AIMI) foram consideradas bons indicadores da fertilidade a campo. Contrariamente, BRITO et al. (2003) não observaram correlação significativa entre a FIV de embriões bovinos e a integridade da membrana plasmática, avaliada pelos testes de Eosina/Negrosina, CFDA/PI, SYBR-14/PI e HOST. No entanto, semelhante aos nossos resultados, JANUSKAUSKAS et al. (2003) relataram correlações significativas ($r^2 = - 0,40$) entre a fertilidade a campo e a porcentagem de células com membrana plasmática lesionada (positivas para PI). Adicionalmente, TARTAGLIONE & RITTA (2004) demonstraram que a combinação do teste pela coloração Eosina/Negrosina com o HOST apresentaram elevado coeficiente de correlação ($r^2 = 78,2$) com a fertilidade *in vitro*. Ainda, quando os resultados de integridade de membranas plasmática e acrossomal (avaliada por Azul de Trypan/Giemsa) foram incluídos no modelo de regressão, um coeficiente de correlação ainda maior ($r^2 = 82,4$) foi obtido (TARTAGLIONE & RITTA, 2004); enfatizando que maior é a capacidade de prever a fertilidade do sêmen quanto maior o número de avaliações espermáticas realizadas.

KASIMANICKAM et al. (2007) em um elegante estudo, relataram que o índice de fertilidade de touro foi positivamente correlacionado com a integridade da membrana plasmática ($r^2 = 0,83$) e também com a motilidade progressiva avaliada pelo CASA ($r^2 = 0,70$). Os autores demonstraram ainda, que a integridade da membrana plasmática e a motilidade progressiva foram negativamente correlacionadas com a peroxidação lipídica do espermatozoide ($r^2 = - 0,78$ e $r^2 = -$

0.83, respectivamente), e que a peroxidação lipídica e a fertilidade do touro apresentaram alta correlação negativa ($r^2 = - 0,78$) (KASIMANICKAM et al., 2007).

No presente estudo, as variáveis espermáticas relacionadas com a estabilidade da membrana plasmática (MIAD) e peroxidação lipídica (MIP) foram selecionadas como importantes preditores da taxa de concepção. Similarmente, correlações negativas entre peroxidação lipídica e taxa de fertilização *in vitro* já foram relatadas em seres humanos (ZABLUDOVSKY et al., 1999). A concentração elevada de ácidos graxos polinsaturados nas membranas espermáticas contribui severamente para a elevada susceptibilidade destas células aos danos oxidativos (KASIMANICKAM et al., 2007). Como demonstrado por outros autores (AITKEN et al., 2007), a formação de EROs pode danificar a estrutura da membrana plasmática, prejudicando a motilidade e a função espermática. Adicionalmente, um alto grau de desestabilização lipídica da membrana plasmática (elevada desordem dos fosfolipídeos de membrana) pode levar à capacitação funcional, reduzindo o tempo de vida do espermatozoide e sua capacidade fecundante (MORTIMER & MAXWELL, 2004; LYDKA et al., 2012). Neste sentido, HALLAP et al. (2006) demonstraram que a quantidade de espermatozoides decapitados pode fornecer informações valiosas sobre a qualidade do sêmen descongelado.

Defeitos maiores e totais, razão largura:comprimento e Fouriers 0 e 2 foram as variáveis morfológicas e morfométricas selecionadas como importantes preditores da fertilidade do presente experimento. Segundo SAACKE (2008), touros de baixa fertilidade geralmente apresentam elevado conteúdo de células morfológicamente anormais no ejaculado. Espermatozoides com cabeças classicamente anormais não conseguem acessar o oócito após IA, uma vez que

não atravessam o trato reprodutivo feminino e/ou não participam da fertilização (SAACKE et al., 1998). Mesmo pequenas diferenças morfométricas na cabeça espermática podem causar grandes diferenças na hidrodinâmica da célula (DRESDNER & KATZ, 1981).

A razão largura:comprimento é um fator derivado a partir das medidas morfométricas básicas da cabeça do espermatozoide e indica a elipticidade da mesma (BELLETI et al., 2005). No presente estudo, esta foi uma das variáveis espermática selecionada como importante preditor da taxa de concepção; indicando que, de fato, o adequado formato elíptico da cabeça do espermatozoide parece ser importante para o potencial de fertilização do mesmo.

Os índices Fourier, que também foram selecionados como importantes preditores da taxa de concepção (Fourier 0 e 2), são uma potencial mensuração da curvatura do perímetro espermático. Estes índices são aferidos por cálculos matemáticos que utilizam amplitudes harmônicas para descrever a forma nuclear do espermatozoide (OSTERMEIER et al., 2001a; 2001b). Segundo SAACKE (2008), o método mais promissor de quantificar alterações no formato da cabeça espermática é por meio de análises de amplitude harmônicas, mensuradas pelos índices Fourier. Neste sentido, OSTERMEIER et al. (2001b) observaram que os índices Fourier foram capazes de detectar pequenas diferenças na forma do núcleo espermático. Ainda, os mesmos autores (OSTERMEIER et al., 2001a) observaram correlação significativa entre os índices Fourier e a fertilidade do reprodutor, onde maiores médias de índices Fourier 0, 1 e 2 foram observados em touros de alta fertilidade, comparado aos touros de baixa fertilidade.

No que diz respeito à avaliação da estrutura cromatínica, o coeficiente que indica a heterogeneidade cromatínica (CV) foi selecionado como um importante preditor da taxa de concepção do presente estudo. ACEVEDO et al. (2002) relataram que a vulnerabilidade do DNA espermático à desnaturação ácida foi positivamente correlacionado com a porcentagem de cabeças anormais, sugerindo que a ocorrência de cabeças defeituosas pode sinalizar anormalidades de cromatina e incompetência do potencial de fertilização espermático. KASIMANICKAM et al. (2007) relataram que alguns efeitos deletérios da peroxidação lipídica nos espermatozoides estão também relacionados com deficiências no DNA espermático, o que pode também reduzir o potencial de fertilização do reprodutor. Segundo os autores, touros com alto índice de fragmentação do DNA espermático apresentam menor potencial de fertilização, ao passo que touros com menor índice de fragmentação no DNA espermático apresentam maior chance de produzir bezerros (KASIMANICKAM et al., 2007).

Embora o presente experimento tenha permitido explorar relações importantes entre a fertilidade *in vivo* do sêmen e suas características espermáticas *in vitro*, julga-se necessário mencionar que os programas de IATF podem levar a uma grande variação de resultados e que apenas três touros foram utilizados no presente estudo. O elevado número de vacas necessário para obter resultados mais precisos sobre as taxas de concepção limitou a possibilidade da utilização de um grande número de touros. Assim, o conjunto de variáveis espermáticas selecionadas como importantes preditores da taxa de concepção deve ser mais profundamente investigado com maior número de touros, a fim de se confirmar os resultados e/ou aumentar a acurácia dos mesmos.

5. Conclusão

A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que a análise PLS foi um interessante método estatístico para explorar e sumarizar a relação entre várias características espermáticas *in vitro* e os resultados de fertilidade a campo. Utilizando-se o método PLS, foi possível selecionar um grupo com as variáveis espermáticas mais importantes na predição da fertilidade *in vivo* dos touros avaliados. Dentre as características espermáticas investigadas, as seguintes variáveis foram selecionadas como importantes preditores da taxa de concepção: motilidade total (TM), motilidade progressiva (PM), velocidade de trajeto (VAP), frequência de batimentos (BCF), porcentagem de células rápidas (RAP), motilidade total após 2 horas de incubação (TM_2h), motilidade progressiva após 2 horas de incubação (PM_2h), velocidade de trajeto após 2 horas de incubação (VAP_2h), frequência de batimentos após 2 horas de incubação (BCF_2h), porcentagem de células rápidas após 2 horas de incubação (RAP_2h), células com funcionalidade de membrana plasmática (células + HOST), células com membranas plasmática e acrossomal íntegras (AIMI), células com alta desorganização da bicamada lipídica (MIAD), células com elevada peroxidação lipídica (MIP), defeitos maiores, defeitos totais, razão largura:comprimento, Fourier 0, Fourier 2, heterogeneidade cromatínica (CV) e concentração espermática.

Por fim, os resultados do presente estudo reforçam a idéia de que a fertilidade do touro *in vivo* parece ser melhor estimada quando uma combinação de diversas análises espermáticas é utilizada na avaliação da qualidade seminal *in vitro*.

V. CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstrados na presente tese salientam a dificuldade e a importância dos estudos a campo, quando as diferenças seminais entre touros e os fatores que influenciam as mesmas são o foco do estudo.

Com relação aos efeitos do período de incubação sobre as características seminais *in vitro*, adverte-se para o fato de que as análises laboratoriais não puderam esclarecer a influência da permanência das palhetas no descongelador, observada no experimento a campo. Ou porque o número de reprodutores utilizados foi muito pequeno, ou o experimento laboratorial não foi capaz de simular corretamente o experimento a campo, ou os fatores testados não foram pertinentes para avaliar as alterações na qualidade do sêmen do presente estudo. Contudo, a razão pela qual o sêmen de alguns touros parece ser mais suscetível e/ou diferentemente afetados quando submetidos a específicos procedimentos, assim como os fatores seminais que são influenciados pelos mesmos, continuará por incentivar novas investigações.

Vale ressaltar, no entanto, que o uso de diferentes touros, meios diluidores, volume da palheta de sêmen, protocolos de descongelamento, inseminadores, procedimentos de manipulação de sêmen, quantidade de aplicadores utilizados, condições ambientais, bem como a utilização de outras e/ou diferentes análises laboratoriais, poderia ter influenciado os resultados obtidos. De qualquer forma, julga-se razoável atentar-se para o fato de que os cuidados de manuseio do sêmen são fundamentais para obterem-se bons índices reprodutivos após IA e

que maior atenção deve ser direcionada ao descongelamento simultâneo, principalmente quando não se utilizam descongeladores elétricos.

Adicionalmente, foi interessante notar que dentre as 21 variáveis selecionadas como importantes preditores da taxa de concepção, 14 delas apresentaram-se coerentes com os resultados do estudo em que a fertilidade a campo foi comparada entre touros. Ou seja, o touro que apresentou numericamente menor ($P > 0,10$) fertilidade a campo, também apresentou: (1) menor ($P < 0,07$) motilidade total; (2) numericamente menor ($P > 0,10$) motilidade progressiva e; (3) menor ($P > 0,10$) porcentagem de células rápidas; (4) menor ($P < 0,05$) motilidade total após 2 h de incubação; (5) menor ($P < 0,06$) motilidade progressiva após 2 h de incubação; (6) menor ($P < 0,06$) porcentagem de células rápidas após 2 h de incubação; (7) menor ($P > 0,10$) porcentagem de células com membrana plasmática funcional (HOST +); (8) menor ($P > 0,10$) porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras; (9) maior ($P < 0,09$) porcentagem de células com elevada peroxidação lipídica; (10) maior ($P < 0,001$) porcentagem de defeitos maiores; (11) maior ($P < 0,001$) porcentagem de defeitos totais; (12) maior ($P < 0,001$) razão largura:comprimento; (13) menor ($P < 0,05$) Fourier 0; (14) maior ($P < 0,05$) heterogeneidade cromatínica.

Por fim, outros trabalhos serão realizados nesta linha de pesquisa, de modo a confirmar os resultados aqui obtidos, na constante busca de selecionar e utilizar técnicas laboratoriais cada vez mais capazes de predizer com maior acurácia a real capacidade fertilizante de uma amostra seminal. Desta forma, espera-se futuramente reduzir a possibilidade da utilização de partidas seminais que possam prejudicar as taxas de concepção.

VI. CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO

Diante do apresentado na presente tese, foi possível concluir que:

(1) A sequência de inseminação após descongelamento simultâneo de diversas palhetas de sêmen pode apresentar diferente efeito, e/ou relevância, nos resultados de fertilidade a campo, dependendo do touro que é utilizado no programa reprodutivo.

(2) O número de palhetas que pode ser simultaneamente descongelado em banho-maria termostaticamente controlado, sem comprometer a fertilidade do sêmen, parece variar para cada touro. Portanto, nos procedimentos de rotina de programas de IATF de grandes rebanhos, parece mais cauteloso não exceder o número de seis palhetas seminais de 0,5 mL para descongelamento simultâneo, caso o procedimento seja realizado com técnicas de manuseio de sêmen e condições ambientais semelhantes ao presente experimento.

(3) Embora tenha sido observado que a fertilidade do sêmen de alguns touros pode ser mais negativamente afetada pelo tempo de permanência no descongelador do que outros, infelizmente, as análises seminais realizadas *in vitro* não foram capazes de esclarecer o efeito da interação entre touro e grupo de palheta observado na fertilidade *in vivo*.

(4) A utilização de touros com bom histórico de fertilidade contribuiu para as satisfatórias taxas de concepção obtidas no programa de IATF das vacas Nelore pós-parto do presente estudo.

(5) Os touros avaliados diferiram em diversas características espermáticas *in vitro*. Apesar de não ter sido observado efeito significativo de touro no experimento a

campo, o reprodutor que apresentou numericamente menor taxa de concepção, também apresentou qualidade seminal inferior de acordo com as análises laboratoriais realizadas.

(6) A análise PLS se apresentou um interessante método para explorar a importância das características espermáticas avaliadas *in vitro* na predição dos resultados da fertilidade *in vivo*.

(7) Utilizando-se o método PLS foi possível selecionar um grupo de variáveis espermáticas consideradas importantes preditores da taxa de concepção: motilidade total (TM), motilidade progressiva (PM), velocidade de trajeto (VAP), frequência de batimentos (BCF), porcentagem de células rápidas (RAP), motilidade total após 2 horas de incubação (TM_2h), motilidade progressiva após 2 horas de incubação (PM_2h), velocidade de trajeto após 2 horas de incubação (VAP_2h), frequência de batimentos após 2 horas de incubação (BCF_2h), porcentagem de células rápidas após 2 horas de incubação (RAP_2h), células com funcionalidade de membrana plasmática (células + HOST), células com membranas plasmática e acrossomal íntegras (AIMI), células com alta desorganização da bicamada lipídica (MIAD), células com elevada peroxidação lipídica (MIP), defeitos maiores, defeitos totais, razão largura:comprimento, Fourier 0, Fourier 2, heterogeneidade cromatínica (CV) e concentração espermática.

(8) Por fim, o presente estudo reforçou a idéia de que a fertilidade *in vivo* do reprodutor pode ser melhor estimada quando utiliza-se uma combinação de análises espermáticas para avaliação da qualidade seminal *in vitro*.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, N.J.; BAME, H.; KUEHN, L.A.; HOHENBOKEN, W.D.; EVENSON, D.P.; SAACKE, R.G. Sperm chromatin structure assay (SCSA) and sperm morphology. In: **Proc. 19th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod.**, p. 84–90, 2002.

AITKEN, R.J., FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioessays**, v.16, p.259–66, 1994.

AITKEN, R.; WINGATE, J.; DE IULLIS, G.; MCLAUGHLIN, E. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Mol. Hum. Reprod.**, v.13, p.203-211, 2007.

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **J. Androl.**, v.10, p.89-98, 1989.

ANDERSSON, M.; TAPONENA, J.; KOSKINENA, E.; DAHLBOMB, M. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and sêmen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. **Theriogenology**, v.61, p.1583-1588, 2004.

ARRUDA, R.P. **Avaliação do sêmen congelado de bovinos. Provas lentas e rápida de termoresistência: Efeito sobre a fertilidade.** 1988. 41f. Dissertação

(Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

ARRUDA, R.P.; BARNABE, V.H.; ALENCAR, M.M.; BARNABE, R.C. Evaluation of frozen bull semen. Quick and slow thermoresistance tests: effects on fertility. **Bras. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.29, p.131–137, 1992.

ARRUDA, R.P.; BARNABE, V.H.; ALENCAR, M.M. Teste de termo-resistencia rapido: uma opção para avaliar a fertilidade do sêmen congelado bovino. **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 12, Belo Horizonte, MG, 1997. Anais Belo Horizonte – MG, p.178-179, 1997.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epi fluorescência, citometria de fluxo, análises 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.; DE ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.31, n.1, p.8-16, 2007.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; 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. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.35, n.2, p.145-151, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. Relatório Anual, São Paulo, p.1-21, 2011.

BALHORN, R.; COSMAN, M.; THORNTON, K.; KRISHNAN, V.V.; CORZETT, M.; BENCH, G.; KRAMER, C.; LEE, J.; HUD, N.V.; ALLEN, M.J.; PRIETO, M.; MEYER-ILSE, W.; BROWN, J.T.; KIRZ, J.; ZHANG, X.; BRADBURY, E.M.; MAKI, G.; BRAUN, R.E.; BREED, W. Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. In: **Gagnon, C. (Ed.), The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications**. Cache River Press, Vienna, pp. 55–70, 1999.

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

BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; VISINTIN, J.A.; VIANA, W.G.; CASAGRANDE, J.F.; ALMEIDA, C.A. Estudo comparativo entre as provas rápida e lenta de termoresistência para avaliação de sêmen congelado. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.4 (3-4), p.6–12, 1980.

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

BARTH, A.D. The relationship between sperm abnormalities and fertility. In: **Proceedings of the 14th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction**, pp. 47–63, 1992.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BÓ, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82–83, p.479–486, 2004.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F. A systematic approach to multi-species sperm morphometrical characterization. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v.25, p.97–107, 2003.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A computational approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotech. Histochem.**, v.79, p.17-23, 2004.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v.22, p.85–90, 2005a.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Anim. Reprod. Sci.**, v.85, p.105–116, 2005b.

BISINOTTO, R.S.; CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E.P. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.93, p.3578–3587, 2010.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord. Vet. Med.**, v.25, n.7/8, p.383-391, 1973.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.307–326, 2003.

BÓ, G.A.; CUTAIA, L.; PERES, L.C.; PINCINATO, D.; MARANA, D.; BARUSELLI, P.S. Technologies for fixedtime artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. **Soc. Reprod. Fert. Suppl.**, v.64, p.223–236, 2007.

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003.

BROWN JR. D.W.; SENGER, P.L.; BECKER, W.C. Effect of group thawing on post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in .5-milliliter French straws. **J. Anim. Sci.**, v.69, p.2303-2309, 1991.

BROUWERS, J.F.; GADELLA.; B.M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v.35, p.1382–1391, 2003.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; DE ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reprod. Domest. Anim.**, v.42, p.479–488, 2007.

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

CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; RUTIGLIANO, H.M.; BRUNO, R.G.S. Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. **J. Dairy Sci.**, v.89, p.4205–4219, 2006.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998.

COLENBRANDER, B.; BROUWERS, J.F.H.M.; NEILD, D.M.; STOUT, T.A.E.; DA SILVA, P.; GADELLA, B.M. Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. **Theriogenology**, v.58, p.341-345, 2002.

COSTA, L.F.; CESAR JR., R.M. Shape Analysis and Classification: Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, EUA, 2001.

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

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

CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Res.**, v.15, p.213–226, 1986.

DALTON, J.C.; AHMADZADEH, A.; SHAFII, B.; PRICE, W.J.; DEJARNETTE, J.M. Effect of simultaneous thawing of multiple 0.5-mL straws of sêmen and sequence of insemination on conception rate in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v.87, p.972-75, 2004.

DE ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J., MARTINS, S.M.M.K.; RAPHAEL, C.F.; MORETTI, A.S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reprod. Domest. Anim.**, v.42, p.190-194, 2007.

DE ANDRADE, A.F.C.; ZAFFALON, F.G.; CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; TARRAGO, O.F.B.; MARTINS, S.M.M.K.; ALONSO, M.A.; ARRUDA, R.P. Addition of Seminal Plasma to Post-thawing Equine Sêmen: What is the Effect on Sperm Cell Viability? **Reprod. Dom. Anim.** v.46, p.682–686, 2011.

DEJARNETTE, J.M.; SHEPARD, R.W.; KAPROTH, M.T.; MICHAEL, N.A.; DALTON, J.C.; GOODELL, G.M.; LEE, C.N. Effects of sequential insemination number after batch-thawing on conception rates of cryopreserved bovine semen: a

review. In: Proceeding of the 19th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. Columbia, MO, USA. p.102-108, 2002.

DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E.; LENZ, R.W.; MONKE, D.R. Sustaining the Fertility of Artificially Inseminated Dairy Cattle: The Role of the Artificial Insemination Industry. **J. Dairy Sci.**, v.87 (E.Suppl), E93–E104, 2004.

DEJARNETTE, J.M. An update on industry application of technology in male reproduction. In: Proceedings of the Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle. Lexington, KY, USA. p.235-256, 2005.

DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé. **Anim. Med. Vet.**, v.4, p.215-224, 1967.

DRESDNER, R.D.; KATZ, D.F. Relationship of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function. **Biol. Reprod.**, v.25, p.920–930, 1981.

EHRlich, R.; WEINBERG, B. An exact method for characterization of grain shape. **J. Sedim. Petrol.**, v.40, p.205–221, 1970.

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

FOOTE, R.H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. **J. Anim. Sci.**, v.80, p.1-10, 2002.

GADELLA, B.M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Anim. Reprod. Sci.**, v.107, p.229-236, 2008.

GALINA, C.S.; ORIHUELA, A.; RUBIO, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 42, p.465-70, 1996.

GALVÃO, K.N.; SÁ FILHO, M.F.; SANTOS, J.E.P. Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.4212–4218, 2007.

GALVÃO, K.N.; SANTOS, J.E.P. Factors affecting synchronization and conception rate after the Ovsynch protocol in lactating Holstein cows. **Reprod. Domest. Anim.**, v.45, p.439-46, 2010.

GAO, D.; MAZUR, P.; CRITSER, J. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: KAROW, A.M.; CRITSER, J.K. (eds.). **Reproductive Tissue Banking**. London: Academic Press, pp.263-328, 1997.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.57, p.1401-1406, 1997.

GOODELL, G. Comparison of AI pregnancy rates in dairy cattle by order of preparation of insemination straws. **J. Anim. Sci.**, v.78 (Suppl 1), p.229, 2000.

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

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Use of fluorescence-activated flow cytometry to determine membrane lipid peroxidation during hypothermic liquid storage and freeze-thawing of viable boar sperm loaded with 4, 4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid. **J. Anim. Sci.**, v.85, p.1402-1411, 2007.

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v.65, p.1122–1136, 2006.

HILLERY, F.L.; PARRISH, J.J.; FIRST, N.L. Bull specific effect on fertilization and embryo development *in vitro*. **Theriogenology**, v.33, p.249, 1990.

HOUGHTON, P.L.; LEMENAGER, R.P.; MOSS, G.E.; HENDRIX, K.S. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. **J. Anim. Sci.**, v.68, p.1428–1437, 1990.

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

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VER, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M. Developement of an assay functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other sêmen characteristics. **J. Reprod. Fertil.**, v.70, p.219-228, 1984.

KAESLER, R.L.; WATERS, J.A. Fourier analysis of the ostracode margine. **Geol. Soc. Am. Bull.**, v.83, p.1169–1178, 1972.

KANAYAMA, C.Y.; BELETTI, M.E. Computational evaluation of chromatin condensation and morphometric characteristics of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) sperm head. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, p.94-99, 2011.

KAPROTH, M.T.; PARKS, J.E.; GRAMBO, G.C.; RYCROFT, H.E.; HERTL, J.A.; GRÖHN, Y.T. Effect of preparing and loading multiple insemination guns on

conception rate in two large commercial dairy herds. **Theriogenology**, v.57, p.909-921, 2002.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; THATCHER, C.D.; NEBEL, R.L.; CASSELL, B.G. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. **Theriogenology**, v.67, p.1004–1012, 2007.

KIELER, J.; OSTROWSKI, K.; STROJNY, P.; ROZYCKA, M.; DZIEDZIC-GOCLAWSK, A.; BULSKI, W. Fourier analysis of the shape of normal and transformed epithelial cells derived from human transitional epithelium. **Histochemistry**, v.81, p.119–128, 1984.

KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; BERG, K.A. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull sêmen. **Acta Vet. Scand.**, v.34, n.3, p.299–303, 1993.

KRISHNAN, A.; WILLIAMS, L.J.; MCINTOSH, A.R.; ABDI, H. Partial Least Squares (PLS) methods for neuroimaging: A tutorial and review. **NeuroImage**, v.56, p.455–475, 2011.

LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict sêmen fertility? **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.327–336, 2000.

LEE, C.N.; HUANG, T.Z.; SAGAYAGA, A.B. Conception rates in dairy cattle are affected by the number of sêmen straws thawed for breeding. **J. Dairy Sci.**, v.80 (Suppl), p.151, 1997.

LEITE, T.G.; VALE FILHO, V.R.; ARRUDA, R.P.; DE ANDRADE, A.F.C.; EMERICK, L.L.; ZAFFALON, F.G.; MARTINS, J.A.M.; ANDRADE, V.J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull sêmen evaluated by CASA and flow cytometry. **Anim. Reprod. Sci.**, v.120, p.31–38, 2010.

LONERGAN, P. The application of *in vitro* fertilization techniques to the prediction of bull fertility. **Reprod. Dom. Anim.**, v.29, p.12-21, 1994.

LYDKA, M.; PIASECKA, M.; GACZARZEWICZ, D.; KOZIOROWSKI, M.; BILINSKA, B. Administration of flutamide alters sperm ultrastructure, sperm plasma membrane integrity and its stability, and sperm mitochondrial oxidative capability in the boar: *in vivo* and *in vitro* Approach. **Reproduction**, 2012 [epud ahead of print]

MADUREIRA, E.D.; PIMENTEL, J.R.V. A IATF como uma ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2005, Goiania. v. 16, p.1-8. 2005

MAIO, J.R.G.; SOUZA, E.D.F.; CARREIRO, S.S.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; SILVA, K.C.F.; SANTOS, G.M.G.; SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, M.M.;

SENEDA, M.M.; BARUSELLI, P.S. Plasmatic progesterone concentration and pregnancy rate of bovine females synchronized to FTAI with Sincrogest (intravaginal progesterone device). **Anim. Reprod.** v.6, p.306, 2008.

MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.30, p.259-266, 1990.

MATURANA FILHO, M.; GOMES, G.C.; CAETANO, C.V.F.; KEHRLE, A.; MIGUEZ, P.H.P.; PIMENTEL, J.R.V.; MADUREIRA, E.H. *In vivo* progesterone release kinetics: a comparative study of different intravaginal devices use in cattle. **Reprod. Fertil. Develop.**, v.23, p.114, 2010.

MELLO, M.L. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v.74, p.387-392, 1982.

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.

MORTIMER, S.J.; MAXWELL, W.M.C. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v.127, p.285-291, 2004.

MYSTKOWSKA, E.T.; KOMAR, A.; STROJNY, P.; ROZYCKA, M.; SAWICKI, W. Fourier analysis of the nuclear and cytoplasmic shapes of living two-cell murine embryos. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v.13, p.209–214, 1991.

NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNISSON, A.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Anim. Reprod. Sci.**, v.80, p.225–235, 2004.

NEILD, D.M.; BROUWERS, J.F.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA, B.M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Mol. Reprod. Dev.**, v.72, p.230–238, 2005.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; DE ANDRADE, A.F.C.; PERINI, A.P.; RESENDE, M.V.; MIGUEL, M.C.V.; LUCIO, A.C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with CASA and fluorescent probes association. **Andrologia**, v.44, p.9-15, 2012.

OSTERMEIER, G.C.; SARGEANT, G.A.; YANDEL, B.S.; EVENSON, D.P.; PARRISH, J.J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **J. Androl.**, v.22, p.595–603, 2001a.

OSTERMEIER, G.C.; SARGEANT, G.A.; YANDEL, B.S.; PARRISH, J.J. Measurement of bovine sperm nuclear shape using the Fourier harmonic amplitudes. **J. Androl.**, v.22, p.584–594, 2001b.

ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **Int. Rev. Cytol.**, v.122, p.105–151, 1990.

PAPADOPOULOS, S.; HANRAHAN, J.P.; DONOVAN, A.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. *In vitro* fertilization as a predictor of fertility from cervical insemination of sheep. **Theriogenology**, v.63, n.1, p.150–159, 2005.

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

PERRY, G.A.; SMITH, M.F.; ROBERTS, A.J.; MACNEIL, M.D.; GEARY, T.W. Relationship between size of ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **J. Anim. Sci.**, v.85, p.684-689, 2007.

PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. **Theriogenology**, v.44, p.915–923, 1995.

PURSLEY, J.R.; SILCOX, R.W.; WILTBANK, M.C. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio

after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.2139–2144, 1998.

RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.; GADELLA, B. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.65, p.462-470, 2001.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine sêmen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.36, p.77-86, 1994.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory sêmen assessment and prediction of fertility: still Utopia? **Reprod. Dom. Anim.**, v.38, p.312–318, 2003.

ROHLF, F.J.; ARCHIE, J.W. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (*Diptera*: Culicidae). **Syst. Zool.**, v.33, p.302–317, 1984

SÁ FILHO, O.J.; MENEGHETTI, M.; PERES, R.; LAMB, G.; VASCONCELOS, J.L.M. Fixedtime artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows. II. Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v.72, p.210–218, 2009.

SÁ FILHO, M.F.; CRESPILO, A.M.; SANTOS, J.E.P.; PERRY, G.A.; BARUSELLI, P.S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous

synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v.120, p.23–30, 2010.

SAACKE, R.G.; DEJARNETTE, J.M.; BAME, J.H.; KARABINUS, D.S.; WHITMAN, S. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? **Theriogenology**, v.51, p.117–128, 1998.

SAACKE, R.G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompenable traits in sêmen. **Theriogenology**, v.70, p.473–478, 2008.

SARAVIA, F.; HERNÁNDEZ, M.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Controlled cooling during sêmen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate. **Int. J. Androl.**, v.30, n.6, p.485-499, 2007.

SAS INSTITUTE, 2001. **STAT[®] User's Guide, Release 8.2**. SAS Institute Inc.; Cary, NC.

SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B. *In vitro* development of bovine embryos after fertilization using sêmen from different donors. **Reprod. Dom. Anim.**, v.28, p.77–84, 1993.

SHI, D.S.; LU, K.H.; GORDON, I. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. **Theriogenology**, v.41, p.1033–1043, 1990.

SCHNEIDER, C.S.; ELLINGTON, J.E.; WRIGHT, R.W. Relationship between bull field fertility and *in vitro* embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. **Theriogenology**, v.51, n.6, p.1085–1098, 1999.

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, M.V.G.B.; SILVEIRA, T.S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Rev. Bras. Zootec.**, v.36, n.2, p.387-395, 2007.

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

SPRENGER, M.J.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Conception rates of sequential inseminations after batch-thawing multiple straws of sêmen: A professional technician case study. **J. Anim. Sci.**, v.79 (Suppl 1), p.253, 2001.

STOREY, B.T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Mol. Hum. Reprod.**, v.3, p.203–213, 1997.

STOREY, B.T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe.

Int. J. Develop. Biol., v.52, n.5-6, p.427-437, 2008.

SUDANO, M.J.; CRESPILO, A.M.; FERNANDES, C.B.; MARTINS JUNIOR, A.; PAPA, F.O.; RODRIGUES, J.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Use of bayesian inference to correlate *in vitro* embryo production and *in vivo* fertility in Zebu bulls. **Vet. Med. Intern.**, ArticleID: 436381, p.1-6, 2011.

SUGULLE, A.H.; BHUIYAN, M.M.U.; SHAMSUDDIN, M. Breeding soundness of bulls and the quality of their frozen sêmen used in cattle artificial insemination in Bangladesh. **Livestock Res. R. Develop.**, v.18, n.54, 2006.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull sêmen. **Theriogenology**, v.62, n.7, p.1245–1252, 2004.

THATCHER, W.W.; DE LA SOTA, R.I.; SCHMITT, E.J.P.; DIAZ, T.C.; BADINGA, L.; SIMMEN, F.A.; STAPLES, C.R.; DROST, M. Control and management of ovarian follicles in cattle to optimize fertility. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.8, p. 203-217, 1996.

VAN DEMARK, N.L.; ESTERGREEN JR.; V.L.; SCHORR, R.; KUHLMAN, D.E. Use of fluorescent dyes for observing bovine spermatozoa in opaque media. **J. Dairy Sci.**, v.42, p.1314-1319, 1959.

VANDAELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Is apoptosis in bovine *in vitro* produced embryos related to early developmental kinetics and *in vivo* bull fertility? **Theriogenology**, v.65, n.9, p.1691–1703, 2006.

VASCONCELOS, J.L.M; SÁ FILHO, O.G. **Não adianta produzirmos um bezerro por vaca por ano precisamos produzir um bezerro de qualidade/vaca/ano.** BeefPoint – Dicas de Sucesso, 05/07/2010. Disponível em: www.beefpoint.com.br. Acesso em: 26/01/2012.

VASCONCELOS, J.L.M; JARDINA, D.T.G.; SÁ FILHO, O.G.; ARAGONB, F.L.; VERAS, M.B. Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropin releasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.75, p.1153–1160, 2011.

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

VIANNA, F.P.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; MELO, C.M.; DELL'AQUA JR., J.A. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.113, p.279–282, 2009.

VISCONTI, P.E.; KOPF., G.S. Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. **Biol. Reprod.**, v.59, p.1–6, 1998.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. **Reprod. Fertil. Develop.**, v.9, p.321-331, 1997.

WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, 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*. **Mol. Reprod. Develop.**, v.60, p.47-55, 2001.

WATERHOUSE, K.E.; GJELDNES, A.; TVERDAL, A.; DE ANGELIS, P.M.; FARSTAD, W.; HÅÅRD, M.; KOMMISRUUD, E. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and *in vitro* incubation of bull sêmen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.117, p.34–42, 2010.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.** v.60-61, p. 481-492, 2000.

WEI, H.; FUKUI, Y. Effects of bull, sperm type and sperm pretreatment on male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection in cattle. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.11, p.59-65, 1999.

WOLD, S. PLS for multivariate linear modeling. **QSAR: chemometric methods in molecular design**, in: Van de Waterbeemd, H. (Ed.), *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*. Verlag-Chemie, Weinheim, Germany, 1994.

ZABLUDOVSKY, N.; ELTES, F.; GEVA, E.; BERKOVITZ, E.; AMIT, A.; BARAK, Y.; HAR-EVEN, D.; BARTOOV, B. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. **Andrologia**, v.31, p.91–98, 1999.

ZAFFALON, F.G. **Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja**. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Relationship between embryo development *in vitro* and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed sêmen from dairy bulls. **Theriogenology**, v.48, p.221-231, 1997.

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 sêmen from young dairy bulls entering an AI-programme. **Internat. J. Androl.**, v.22, p.253–260, 1999.

VIII. APÊNDICE

Quadro 1. Dados descritivos, de cada partida, das características espermáticas *in vitro* do sêmen dos três diferentes touros utilizados no programa de IATF

	Touro 1		Touro 2		Touro 3		
	Palheta1-Lab	Palheta10-Lab	Palheta1-Lab	Palheta10-Lab	Palheta1-Lab	Palheta10-Lab	
TM	Partida 1	46,60	31,77	24,38	15,80	28,13	20,77
	Partida 2	54,93	36,57	42,17	29,61	51,78	53,44
	Partida 3	51,59	45,75	34,22	30,21	58,45	48,97
	Total (%)	51,0 ± 4,2	38,0 ± 7,1	33,6 ± 8,9	25,2 ± 8,2	46,1 ± 15,9	41,1 ± 17,7
PM	Partida 1	41,45	18,77	20,48	14,16	21,56	15,50
	Partida 2	49,21	31,67	34,81	25,78	33,81	33,38
	Partida 3	42,18	37,96	28,63	24,49	40,68	36,79
	Total (%)	44,3 ± 4,3	29,5 ± 9,8	28,0 ± 7,2	21,5 ± 6,4	32,0 ± 9,7	28,6 ± 11,4
RAPID	Partida 1	43,00	19,87	21,95	14,39	22,44	16,36
	Partida 2	51,03	32,05	36,33	26,39	37,09	35,82
	Partida 3	43,94	39,79	29,50	25,21	46,65	41,09
	Total (%)	46,0 ± 4,4	30,6 ± 10,0	29,3 ± 7,2	22,0 ± 6,6	35,4 ± 12,2	31,1 ± 13,0
TM_2h	Partida 1	30,00	8,87	5,18	2,11	17,64	8,60
	Partida 2	8,59	7,66	10,39	10,76	43,31	47,46
	Partida 3	20,85	21,57	4,75	3,44	16,25	12,81
	Total (%)	19,8 ± 10,7	12,7 ± 7,7	6,8 ± 3,1	5,4 ± 4,7	25,7 ± 15,2	23,0 ± 21,3
PM_2h	Partida 1	25,79	5,23	3,21	1,16	15,27	4,70
	Partida 2	6,06	3,93	7,21	6,81	22,91	26,90
	Partida 3	16,05	17,48	3,38	2,56	9,09	8,43
	Total (%)	16,0 ± 9,9	8,9 ± 7,5	4,6 ± 2,3	3,5 ± 2,9	15,8 ± 6,9	13,3 ± 11,9
RAP_2h	Partida 1	26,57	5,33	3,43	1,19	16,18	5,30
	Partida 2	6,65	4,18	8,07	7,24	26,43	30,63
	Partida 3	17,35	18,70	3,38	2,67	9,78	9,68
	Total (%)	16,9 ± 9,9	9,4 ± 8,1	5,0 ± 2,7	3,7 ± 3,2	17,5 ± 8,4	15,2 ± 13,5
HOST	Partida 1	41,00	30,00	21,00	21,00	27,00	25,00
	Partida 2	32,00	28,00	54,00	38,00	66,00	63,00
	Partida 3	40,00	35,00	27,00	22,00	45,00	42,00
	Total (%)	37,67 ± 4,93	31,00 ± 3,61	34,00 ± 17,58	27,00 ± 9,54	46,00 ± 19,52	43,33 ± 19,04
AIMI	Partida 1	43,80	43,60	31,10	26,70	31,10	29,30
	Partida 2	31,60	29,40	42,30	39,70	60,30	50,30
	Partida 3	41,90	41,30	36,00	34,80	50,10	46,70
	Total (%)	39,1 ± 6,6	38,1 ± 7,6	36,5 ± 5,6	33,7 ± 6,6	47,2 ± 14,8	42,1 ± 11,2
ALML	Partida 1	33,10	37,50	40,20	50,60	38,70	39,70
	Partida 2	39,80	46,40	24,00	29,00	7,30	10,30
	Partida 3	19,40	18,60	26,70	33,70	15,50	17,00
	Total (%)	30,8 ± 10,4	34,2 ± 14,2	30,3 ± 8,7	37,8 ± 11,4	20,5 ± 16,3	22,3 ± 15,4
MIAD	Partida 1	1,10	1,10	1,60	2,40	0,50	0,10
	Partida 2	1,60	0,30	5,50	5,40	5,80	6,60
	Partida 3	0,80	0,50	0,30	0,40	3,40	4,50
	Total (%)	1,17 ± 0,40	0,63 ± 0,42	2,47 ± 2,71	2,73 ± 2,52	3,23 ± 2,65	3,73 ± 3,32
MIP	Partida 1	0,70	0,40	4,00	0,70	0,20	0,10
	Partida 2	0,30	0,30	1,80	0,60	0,50	0,50
	Partida 3	0,60	0,30	0,50	0,40	0,70	0,60
	Total (%)	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	2,1 ± 1,8	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2

MINP	Partida 1	33,80	35,50	24,80	19,50	22,10	16,50
	Partida 2	27,10	21,50	34,90	27,40	51,60	50,00
	Partida 3	31,90	31,30	31,30	27,80	48,70	46,00
	Total (%)	30,9 ± 3,5	29,4 ± 7,2	30,3 ± 5,1	24,9 ± 4,7	40,8 ± 16,3	37,5 ± 18,3
Def_Ma	Partida 1	19,00	15,50	19,50	25,50	14,00	11,50
	Partida 2	14,00	12,00	26,50	26,00	7,50	9,00
	Partida 3	10,00	15,00	24,50	30,00	15,00	14,00
	Total (%)	14,33 ± 4,51	14,17 ± 1,89	23,50 ± 3,61	27,17 ± 2,47	12,17 ± 4,07	11,50 ± 2,50
Tot_Def	Partida 1	23,00	24,00	33,00	37,50	30,00	21,50
	Partida 2	26,00	21,00	35,50	35,00	19,50	25,00
	Partida 3	21,00	30,50	33,00	36,00	36,00	35,00
	Total (%)	23,33 ± 2,52	25,17 ± 4,86	33,83 ± 1,44	36,17 ± 1,26	28,50 ± 8,35	27,17 ± 7,01
L/C	Partida 1	0,519	0,524	0,528	0,547	0,515	0,509
	Partida 2	0,520	0,529	0,535	0,539	0,533	0,514
	Partida 3	0,516	0,520	0,534	0,545	0,518	0,519
	Total	0,518 ± 0,002	0,525 ± 0,005	0,532 ± 0,004	0,544 ± 0,004	0,522 ± 0,010	0,514 ± 0,005
Fourier0	Partida 1	3612,7	3490,9	3570,5	3603,3	3936,7	4062,4
	Partida 2	4120,8	4208,3	3694,1	3520,7	3825,7	3912,4
	Partida 3	3986,6	3891,2	3628,3	3559,7	3743,3	4018,6
	Total	3906,7±263,3	3863,5±359,5	3631,0±61,8	3561,2±41,3	3835,2±97,1	3997,8±77,1
Fourier2	Partida 1	300,6	284,2	322,4	359,7	324,8	327,6
	Partida 2	329,9	378,1	323,0	317,1	364,8	347,4
	Partida 3	341,6	315,8	341,9	287,1	297,4	317,4
	Total	324,03 ± 21,10	326,02 ± 47,77	329,09 ± 11,07	321,30 ± 36,45	328,99 ± 33,87	330,79 ± 15,28
Dif	Partida 1	4,32	5,88	6,25	5,18	16,38	7,72
	Partida 2	5,63	5,03	8,94	7,41	3,96	4,69
	Partida 3	3,89	11,78	6,22	13,55	5,76	5,00
	Total (%)	4,6 ± 0,9	7,6 ± 3,7	7,1 ± 1,6	8,7 ± 4,3	8,7 ± 6,7	5,8 ± 1,7
CV	Partida 1	5,54	6,38	11,03	9,65	10,95	10,16
	Partida 2	12,43	12,85	10,26	12,93	8,52	7,21
	Partida 3	6,45	6,59	10,63	10,67	5,94	7,63
	Total (%)	8,1 ± 3,7	8,6 ± 3,7	10,6 ± 0,4	11,1 ± 1,7	8,5 ± 2,5	8,3 ± 1,6
Concent	Partida 1	45,00	45,00	25,00	25,00	60,00	60,00
	Partida 2	35,00	35,00	20,00	20,00	55,00	55,00
	Partida 3	25,00	25,00	50,00	50,00	75,00	75,00
	Sptz/mL	35,00 ± 10,00	35,00 ± 10,00	31,67 ± 16,07	31,67 ± 16,07	63,33 ± 10,41	63,33 ± 10,41