UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

RELAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS EM TOUROS SENEPOL COM A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Suzane Peres Campanholi
Médica Veterinária

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

RELAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS EM TOUROS SENEPOL COM A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Discente: Suzane Peres Campanholi

Orientadora: Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes

Coorientador: Dr. Fabio Morato Monteiro

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, área de Reprodução Animal.

2019

C186r

Campanholi, Suzane Peres
Relação das subpopulações espermáticas em touros Senepol com a produção in vitro de embriões / Suzane Peres Campanholi. -- Jaboticabal, 2019
102 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Lindsay Unno Gimenes
Coorientador: Fabio Morato Monteiro

1. Bovino. 2. Espermatozoides. 3. Fertilização. 4. Movimento. 5. Inteligência artificial. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: RELAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS EM TOUROS SENEPOL COM A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

AUTORA: SUZANE PERES CAMPANHOLI
ORIENTADORA: LINDSAY UNNO GIMENES
COORIENTADOR: FABIO MORATO MONTEIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. MAYRA ELENA ORTIZ D'AVILA ASSUMPÇÃO
Departamento de Reprodução Animal-FMVZ/USP / São Paulo/SP

Prof. Dr. ANTONIO SERGIO FERRAUDO
Diretoria / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. MARCELO FÁBIO GOUVEIA NOGUEIRA
Departamento de Ciências Biológicas / UNESP/ Câmpus de Assis

Pesquisador Dr. MARCELO RONCOLETTA
Top in Life Biotecnologia e Genética Animal / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 08 de novembro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SUZANE PERES CAMPANHOLI – nascida em São Paulo/SP, em 13 de junho de 1991. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Câmpus de Jaboticabal em fevereiro de 2014. Durante a graduação foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, na modalidade de Iniciação Científica, pelo Centro APTA Bovinos de Corte, unidade de pesquisa do Instituto de Zootecnia, localizado em Sertãozinho/SP, sob a orientação do PQC Dr. Fabio Morato Monteiro de agosto de 2012 a julho de 2013. Em março de 2014 ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", sob a orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia e coorientação do PQC Dr. Fabio Morato Monteiro. Durante o período de mestrado foi bolsista de treinamento técnico da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, de março a abril de 2014 e bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, de maio de 2014 a fevereiro de 2016. Em fevereiro de 2016 defendeu a dissertação intitulada "Efeito da centrifugação e filtragem do sêmen bovino sobre a criopreservação espermática". Em março do mesmo ano ingressou no curso de Doutorado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", sob a orientação da Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes e coorientação do PQC Dr. Fabio Morato Monteiro. Durante o período de doutorado foi bolsista da CAPES/PROEX, de fevereiro a novembro de 2017 e da FAPESP, de dezembro de 2017 a maio de 2019 (Processo 2016/24107-7).

“Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento. Ele reserva a verdadeira sabedoria para os retos; é escudo para os que caminham na sinceridade, guarda as veredas do juízo e conserva o caminho dos seus santos. Então, entenderás justiça, juízo e equidade, todas as boas veredas. Porquanto a sabedoria entrará no teu coração, e o conhecimento será agradável à tua alma”.

Provérbios 2:6-10.

Aos meus pais Heleine e Gilberto, meu irmão Heitor, meus avós Luzia e Manoel (*in memorian*), meu marido Marcus Vinicius e nosso filho Artur que está a caminho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me abençoado com a realização de mais este sonho, pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus pais Heleine e Gilberto, por permanecerem ao meu lado em todos os momentos desta caminhada e por não pouparem esforços para que eu chegasse ao fim, torcendo sempre pela realização dos meus sonhos e dedicando grande parte das suas vidas para construir a minha.

Ao meu irmão Heitor, por ser o meu fiel companheiro desde pequena, alegrando os meus dias e tornando todas as lutas mais leves. Ele sempre comemora comigo as minhas conquistas.

A minha avó Luzia, por ter sido a minha companheira em todos os momentos desses quatro anos, me ajudando a superar os momentos difíceis e comemorando as minhas vitórias em cada momento. Você é incrível Luzinha.

Ao meu marido Marcus Vinicius, por sempre torcer pelo meu sucesso, me amar em todos os momentos e me dar forças para não desistir em nenhuma dificuldade.

A todos os meus familiares e amigos, que confiaram na minha capacidade, estiveram ao meu lado e sempre torceram por mim. Cada um de vocês faz diferença na minha vida.

A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Câmpus de Jaboticabal-SP, em especial ao Departamento de Reprodução Animal pela oportunidade e acolhida, e a todos docentes e servidores por me proporcionarem um ensino de ótima qualidade.

A minha orientadora, Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes, pelo exemplo profissional e ensinamentos, por confiar no meu trabalho e abrir as portas para esse crescimento profissional tão importante em minha vida.

Ao meu coorientador, PQC Dr. Fabio Morato Monteiro, pelo incentivo e apoio, pelas correções e aprendizado em cada momento e motivação para chegar até o fim. Aquele que acreditou em mim desde a iniciação científica.

Ao Sebastião Garcia Neto, da empresa Senepol 3G, que confiou na minha pesquisa e no meu trabalho e forneceu as doses de sêmen para que este trabalho fosse realizado.

A Andrea Cristina Basso, da empresa In Vitro Brasil, por me ajudar com a coleta dos dados de produção embrionária e fornecimento de informações que foram essenciais para realização dessa pesquisa.

Aos docentes, funcionários e amigos da USP de São Paulo, em especial a Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção e ao Prof. Dr. Marcílio Nichi, pelo apoio e parceria com a minha pesquisa, disponibilizando seus laboratórios e equipes (em especial, João Diego de Agostini Losano e Adriano Felipe Perez Siqueira) para realização de todas as análises no sêmen.

A pesquisadora Dra. Claudia Cristina Paro Paz, juntamente com sua orientada Luara Afonso de Freitas, pela colaboração nas análises estatísticas, prestatividade em todos os momentos que precisei e carinho. Vocês me ajudaram em um momento bastante complicado e tiveram paciência para sanar todas as minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Antonio Sérgio Ferraudo, pela colaboração nas análises estatísticas, incentivo e conselhos.

A todos docentes que fizeram parte das bancas de qualificação que contribuíram com seus ensinamentos, críticas e sugestões para melhorar o meu trabalho e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização do meu doutorado.

Aos meus colegas de doutorado que dividiram os momentos de dificuldades, me dando apoio para acreditar que no final tudo daria certo e dividindo as alegrias em cada conquista do trabalho de cada um.

A todos os estagiários que em algum momento caminharam comigo uma parte desta jornada, aliviaram momentos de estresse e trocaram experiências importantes que contribuíram para a finalização deste trabalho e para meu crescimento pessoal também.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (Processo 2016/24107-7).

Por fim, agradeço a todos os animais que são o motivo da minha paixão pela profissão. Com vocês aprendi que respeito e afetividade não são transmitidos somente com palavras.

SUMÁRIO

Página

RESUMO..... iv
ABSTRACT..... v
LISTA DE ABREVIATURAS..... vi
LISTA DE TABELAS..... x
LISTA DE FIGURAS..... xi
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS..... 1
1. Introdução..... 1
2. Revisão de literatura..... 3
2.1 Análise computadorizada do sêmen..... 4
2.2 Análise das subpopulações espermáticas..... 6
2.3 Análises no citômetro de fluxo..... 9
2.4 Análise da morfologia espermática..... 12
2.5 Estimativa da fertilidade..... 13
3. Referências..... 15
CAPÍTULO 2 - ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES COM BASE NAS SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS EM TOUROS SENEPOL..... 30
Resumo..... 30
1. Introdução..... 30
2. Material e métodos..... 32
2.1 Coleta dos dados de produção embrionária..... 32
2.2 Seleção e acondicionamento das amostras..... 32
2.3 Descongelação do sêmen..... 33
2.4 Lavagem do sêmen..... 33
2.5 Análises no sêmen..... 33
2.5.1 Análise da morfologia espermática..... 34
2.5.2 Análise da cinética espermática geral da amostra..... 34
2.5.3 Análise da cinética individual dos espermatozoides..... 35
2.5.4 Análises no citômetro de fluxo..... 36
2.6 Análises estatísticas..... 39
3. Resultados..... 40

4. Discussão..... 46
5. Conclusões..... 53
6. Referências..... 53
CAPÍTULO 3 – REDES NEURAIS ARTIFICIAIS NA ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES..... 61
Resumo..... 61
1. Introdução..... 61
2. Material e métodos..... 63
2.1 Análises no sêmen..... 63
2.2 Análises estatísticas..... 64
2.2.1 Redes neurais artificiais (RNAs)..... 64
3. Resultados..... 66
4. Discussão..... 68
5. Conclusões..... 74
6. Referências..... 74

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Relação das subpopulações espermáticas em touros Senepol com a produção *in vitro* de embriões"**, protocolo nº 12.807/16, sob a responsabilidade da Profª Drª Lindsay Unno Gimenes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 18 de agosto de 2016.

Vigência do Projeto	01/10/2017 a 14/12/2019
Espécie / Linhagem	Bovina
Nº de animais	40 amostras (doses) de sêmen
Peso / Idade	Amostras provenientes de animais de 3 a 8 anos / PC médio 700kg
Sexo	Machos
Origem	Empresa Senepol Mais – Comércio de Sêmen Ltda.

Jaboticabal, 18 de agosto de 2016.

Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

RELAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS EM TOUROS SENEPOL COM A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

RESUMO – Em bovinos, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) configura-se como uma das biotecnologias reprodutivas de maior importância no Brasil, sendo responsável pela rápida expansão da raça Senepol em nosso país. Estimar a PIVE em animais Senepol com base na análise seminal dos reprodutores seria valioso para a indústria de criopreservação de sêmen, institutos de pesquisa e criadores da raça. Espermatozoides que diferem quanto ao seu padrão de motilidade coexistem em um ejaculado e podem ser agrupados em diferentes subpopulações espermáticas após análise da cinética com o sistema CASA (*Computer-assisted sperm analysis*). Aliar essa avaliação com outras análises de qualidade espermática e analisar os resultados com estatísticas multivariadas e inteligência artificial pode ajudar a melhorar a estimativa de fertilidade de um reprodutor. Diante disso, os objetivos no presente estudo foram: 1) identificar e caracterizar as subpopulações espermáticas no sêmen criopreservado de touros Senepol após processo de lavagem para fertilização *in vitro* (FIV); 2) gerar um modelo estatístico para estimar a PIVE com base nas subpopulações espermáticas e demais atributos espermáticos analisados, utilizando análises estatísticas multivariadas e 3) aplicar a inteligência artificial, por meio do uso das redes neurais artificiais (RNAs) com o intuito de melhorar a estimativa da PIVE. Dados retrospectivos de 386 rotinas de PIVE foram obtidos a partir dos registros pertencentes à empresa In Vitro Brasil e a produção embrionária foi categorizada em alta, média e baixa. Após, 38 amostras de sêmen criopreservado de touros Senepol, utilizadas nas rotinas de PIVE, foram adquiridas da empresa Senepol 3G para avaliação. Pós-descongelação todas as amostras passaram por avaliação da morfologia espermática e em seguida foram submetidas a um processo de lavagem que é realizado antes da FIV. Pós-lavagem todas as amostras foram avaliadas pelo sistema CASA para obter a cinética geral das amostras e a cinética individual dos espermatozoides. Ademais, foi realizada avaliação, por citometria de fluxo, da integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, status oxidativo e resistência da cromatina. Após análises multivariadas de componentes principais e agrupamento foram identificadas três subpopulações espermáticas: SBP1 (movimento rápido e progressivo), SBP2 (movimento hiperativado) e SBP3 (movimento lento e não progressivo). Com a análise de regressão logística foi constatado que a PIVE sofre efeito da SBP1 e SBP2 e um modelo com essas variáveis foi gerado para estimar as categorias de produção embrionária. Com a análise de RNAs foram gerados modelos para estimar a PIVE com 18, oito e seis variáveis preditoras, sendo que o modelo mais simples incluiu as três subpopulações espermáticas e as variáveis de integridade das membranas plasmática e acrossomal, alto potencial mitocondrial e defeitos totais como preditores.

Palavras-chave: bovino, espermatozoide, fertilidade, cinética espermática, citometria de fluxo, inteligência artificial

RELATIONSHIP BETWEEN SPERM SUBPOPULATIONS IN SENEPOL BULLS WITH *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION

ABSTRACT – In cattle, *in vitro* embryo production (IVEP) is one of the most important reproductive biotechnologies in Brazil, being responsible for the rapid expansion of the Senepol breed in our country. Estimating IVEP in Senepol animals based on seminal analysis of breeders would be valuable for the semen cryopreservation industry, research institutes and Senepol cattle breeders. Spermatozoa that differ in their motility pattern coexist in an ejaculate and can be grouped into different sperm subpopulations after kinetic analysis with the CASA system (Computer-assisted sperm analysis). Combining this assessment with other analyzes of sperm quality and analyzing the results with multivariate statistics and artificial intelligence can help to improve a breeder's fertility estimate. Therefore, the objectives in the present study were: 1) identify and characterize sperm subpopulations in cryopreserved semen of Senepol bulls after washing process for *in vitro* fertilization (IVF); 2) generate a statistical model to estimate IVEP based on the sperm subpopulations and other sperm attributes analyzed, using multivariate statistical analysis and 3) apply artificial intelligence, through the use of artificial neural networks (ANNs) in order to improve the estimate of IVEP. Retrospective data from 386 IVEP routines were obtained from the records belonging to the enterprise In Vitro Brasil and embryonic production was categorized as high, medium and low. After, 38 samples of cryopreserved semen from Senepol bulls, used in IVEP routines, were acquired from the enterprise Senepol 3G for evaluation. After thawed, all samples were evaluated for sperm morphology and then subjected to a washing process that is performed before IVF. After washing, all samples were evaluated by the CASA system to obtain the general kinetics of the samples and the individual kinetics of the sperm. In addition, flow cytometry was evaluated for the integrity of the plasma and acrosomal membranes, mitochondrial potential, oxidative status and chromatin resistance. After multivariate analyzes of principal components and grouping, three sperm subpopulations were identified: SBP1 (fast and progressive motility), SBP2 (hyperactived motility) and SBP3 (slow and non-progressive motility). With the logistic regression analysis, it was found that IVEP suffers the effect of SBP1 and SBP2 and a model with these variables was generated to estimate the categories of embryonic production. With the analysis of ANNs, models were generated to estimate IVEP with 18, eight and six predictor variables, and the simplest model included the three sperm subpopulations and the variables plasma and acrosomal membranes integrity, high mitochondrial potential and total defects such as predictors.

Keywords: bovine, spermatozoa, fertility, sperm kinetics, flow cytometry, artificial intelligence

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCB	Associação brasileira dos criadores de bovinos
ACP	Análise de componentes principais
ALH	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide
ANNs	*Artificial neural networks*
APM	Alto potencial mitocondrial
ASMA	*Assisted sperm morphometry analysis*
ATP	Adenosina trifosfato
BCF	Frequência de batimento flagelar cruzado
BPM	Baixo potencial mitocondrial
ºC	Graus Celsius
Ca^{2+}	Cálcio
CA	Califórnia
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CASA	*Computer-assisted sperm analysis*
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
cm	Centímetro
CN	Carolina do Norte
CNPq	Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico
CP	Componente principal
DIC	*Differential interference contrast*
DMA	Defeitos maiores
DME	Defeitos menores
DNA	*Deoxyribonucleic acid*
DT	Defeitos totais
EDTA	*Ethylenediamine tetraacetic acid*
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas ao oxigênio
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

FITC-PSA	Aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína
FIV	Fertilização *in vitro*
GENMOD	*Generalized linear model*
GLM	*General linear models*
HCl	Ácido clorídrico
H_2DCFDA	*2'7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate*
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
IP	Iodeto de propídio
IP-VD-	Membrana plasmática íntegra e sem estresse oxidativo
IP-VD+	Membrana plasmática íntegra e com estresse oxidativo
IP+VD-	Membrana plasmática lesionada e sem estresse oxidativo
IP+VD+	Membrana plasmática lesionada e com estresse oxidativo
IVEP	*In vitro embryo production*
JC-1	Iodeto de tetraetilbenzimidazol-carbocianina
LA-	Alta resistência da cromatina
LA+	Baixa resistência da cromatina
LIN	Linearidade
M	Molar
MA	Massachusetts
MED	Velocidade média
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MO	Missouri
MOT	Motilidade total
mw	Milliwatts
Nº	Número
NaCl	Cloreto de sódio
Na_2HPO_4	Fosfato dissódico
nm	Nanômetro

OR	Oregon
pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	*Phosphate buffered saline*
PIAI	Membranas plasmática e acrossomal íntegras
PIAL	Membranas plasmática íntegra e acrossomal lesionada
PIB	Produto interno bruto
PIVE	Produção *in vitro* de embriões
PLAI	Membranas plasmática lesionada e acrossomal íntegra
PLAL	Membranas plasmática e acrossomal lesionadas
PQC	Pesquisador
PR	Paraná
PROC	*Procedure*
PROG	Motilidade progressiva
RAP	Velocidade rápida
RNAs	Redes neurais artificiais
SAS	*Statistical Analysis Software*
SBP1	Subpopulação 1
SBP2	Subpopulação 2
SBP3	Subpopulação 3
SCSA	*Sperm Chromatin Structure Assay*
SLOW	Velocidade lenta
SP	São Paulo
STATIC	Estático (espermatozoide sem movimento)
STR	Retilinearidade
TE	Transferência de embriões
TNE	Tris-HCl, NaCl e EDTA
UNESP	Universidade Estadual Paulista
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro
µm/s	Micrômetro por segundo

VAP	Velocidade média da trajetória
VCL	Velocidade curvilinear
VSL	Velocidade linear progressiva
WOB	Coeficiente de oscilação
%	Porcentagem

LISTA DE TABELAS

Página

Capítulo 2 – Estimativa da produção *in vitro* de embriões com base nas subpopulações espermáticas em touros Senepol

Tabela 1 Padrão cinético de 38 partidas de sêmen de touros Senepol pós-lavagem para fertilização *in vitro*. 41

Tabela 2 Morfologia espermática avaliada pós-descongelação, e integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, status oxidativo e resistência da cromatina, avaliadas em 38 amostras de sêmen de touros Senepol, pós-lavagem para fertilização *in vitro*. 42

Tabela 3 Cargas dos componentes principais 1 e 2 (CP1 e CP2) avaliada nos dados, obtidos pelo sistema CASA, do sêmen de touros Senepol, pós-lavagem para fertilização *in vitro*. 44

Tabela 4 Média (± EPM) dos parâmetros de cinética das três subpopulações espermáticas, identificadas em 38 amostras de sêmen criopreservado de touros Senepol após passar por processo de lavagem para fertilização *in vitro*. 46

Capítulo 3 – Redes neurais artificiais na estimativa da produção *in vitro* de embriões

Tabela 1 Morfologia espermática avaliada pós-descongelação, e integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, status oxidativo e resistência da cromatina, avaliadas em 38 amostras de sêmen de touros Senepol pós-lavagem para fertilização *in vitro*. 67

LISTA DE FIGURAS

Página

Capítulo 2 – Estimativa da produção *in vitro* de embriões com base nas subpopulações espermáticas em touros Senepol

Figura 1 Gráfico Biplot (CP1xCP2) da distribuição dos 3114 espermatozoides e parâmetros cinéticos avaliados no sêmen de touros Senepol pós-lavagem para fertilização *in vitro*. 43

Figura 2 Dendrograma derivado da análise de agrupamento hierárquico dos 3114 espermatozoides avaliados no sêmen de touros Senepol pós-lavagem para fertilização *in vitro*. 44

Figura 3 Padrão cinético com a divisão em três subpopulações de espermatozoides (SBP1, SBP2 e SBP3) na avaliação do sêmen de touros Senepol pós-lavagem para fertilização *in vitro*. 45

Capítulo 3 – Redes neurais artificiais na estimativa da produção *in vitro* de embriões

Figura 1 Ilustração do modelo de redes neurais artificiais com seis variáveis (SBP1, SBP2, SBP3, PIAI, APM e DT) para estimativa das três categorias de produção *in vitro* de embriões (alta, média e baixa) na raça Senepol. 68

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

O agronegócio configura-se como um setor que apresenta grande importância no produto interno bruto (PIB) do nosso país. Em 2018, o PIB do agronegócio gerou 1,44 trilhão de reais, que representa cerca de 21% do PIB brasileiro. É importante destacar que o ramo da pecuária é responsável por 26,5% do PIB do agronegócio, configurando-se como importante atividade no Brasil (CEPEA, 2018). Para 2018, dados preliminares estimam 214,69 milhões de cabeças de bovinos em nosso país (ABIEC, 2019). Neste segmento, o Brasil é detentor do segundo maior rebanho bovino do mundo, segundo maior produtor de carne bovina do mundo e líder mundial em exportação (USDA, 2019).

Uma raça que está em crescimento exponencial no Brasil é a raça Senepol, que em 2018 apresentou rebanho de 99.778 animais registrados no país. De acordo com dados divulgados pela Associação Brasileira dos Criadores de Bovinos Senepol (ABCB Senepol), a raça apresentou crescimento de 11,2% em 2018, elevando o total de animais puros em 308% no acumulado desde 2012, o que confirma a tendência de maior investimento na raça nos últimos anos (ABCB Senepol, 2019b). A raça Senepol tem sua origem na ilha caribenha de Saint Croix, Ilhas Virgens Americanas, durante o início da década de 1900, por meio do acasalamento de animais das raças taurinas N'Dama (africana) e Red Poll (britânica). Em 1950, a raça foi oficialmente reconhecida, estabelecendo-se como uma opção de raça taurina que pode ser utilizada em diferentes estratégias para a produção de carne, apresentando como principal diferencial, a viabilização do uso de genética taurina em sistemas de produção desenvolvidos em condições tropicais (Okamura, 2015).

Desde a introdução dos primeiros animais em solo brasileiro no ano 2000, a raça vem ganhando popularidade e faz do Brasil um celeiro da genética mundial, contando com cerca de 785 criadores associados à ABCB Senepol (ABCB Senepol, 2019a). Em 2017, a raça Senepol foi a 9ª colocada no ranking de vendas de sêmen, considerando as 41 raças de corte com comercialização de sêmen no Brasil, com 90.610 doses comercializadas (ASBIA, 2017).

O crescimento do rebanho brasileiro baseia-se, principalmente, no uso de biotecnologias reprodutivas. Touros e matrizes de destaque na raça tem sido utilizados intensivamente em programas de transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* de embriões (PIVE), deixando grande número de descendentes (Okamura, 2015). A PIVE é a técnica de eleição, correspondendo a 92% do total de embriões produzidos no Brasil em 2017, sendo que o grupamento taurino representa 68,4% do total de embriões produzidos *in vitro* (Viana, 2018).

Apesar do crescimento da raça Senepol no Brasil e de sua participação efetiva na bovinocultura de corte, poucos estudos têm sido relatados sobre seus aspectos reprodutivos. No que diz respeito aos resultados da PIVE, diferenças entre raças, touros e ejaculados são fatores que devem ser considerados (El-Aziz et al., 2016). A eficiência da PIVE está intimamente relacionada a diferentes atributos espermáticos, sendo importante destacar que há variabilidade inerente entre espermatozoides dentro de um ejaculado, entre ejaculados e entre indivíduos (Arruda et al., 2013, Rodríguez-Martínez, 2013).

Quanto mais características espermáticas são avaliadas em uma amostra seminal, maior acurácia é obtida sobre a fertilidade, o que contribui para melhorar a produtividade do rebanho (Celeghini et al., 2017). É possível aprimorar a avaliação de um ejaculado com o uso da avaliação computadorizada do sêmen (*Computer-assisted sperm analysis;* CASA) e identificar diferentes subpopulações espermáticas, por meio da caracterização da trajetória de cada espermatozoide e detecção de diferenças sutis nos parâmetros de motilidade de cada célula (Quintero-Moreno et al., 2003; Kanno et al., 2017). Há evidências de que as subpopulações espermáticas refletem na variação da fertilidade de um ejaculado (Ferraz et al., 2014; Yániz et al., 2015; Gallego et al., 2017; Maylem et al., 2017).

Na busca da associação de técnicas de avaliação do sêmen com o intuito de melhorar a estimativa da fertilidade de um animal, a aplicação de sondas fluorescentes é interessante, visto que permite a avaliação estrutural e funcional dos espermatozoides de forma ampla, criteriosa e rápida (Bergstein et al., 2014). Aliado ao uso das sondas fluorescentes, a aplicação da citometria de fluxo permite que um número expressivo de espermatozoides seja avaliado em curto período de tempo e permite a avaliação de múltiplos parâmetros simultaneamente em uma mesma

célula (Gillan et al., 2005). Associar o uso do CASA com a citometria de fluxo já provou poder fornecer uma previsão razoável da fertilidade no sêmen bovino (Sellem et al., 2015).

Uma ferramenta que pode ser utilizada para classificar, reconhecer padrões e realizar previsões é o uso das redes neurais artificiais (RNAs). As RNAs são um tipo de inteligência artificial, que consiste em modelos computacionais inspirados e desenvolvidos segundo os princípios de funcionamento do cérebro humano e de suas células nervosas, que é utilizada na modelagem de sistemas não lineares. Em medicina veterinária, os estudos aplicaram essa metodologia para estimar ou prever índices zootécnicos, como: curva de crescimento, peso ao nascimento, produção de leite e produção de ovos (Grzesiak et al., 2003; Fernandez et al., 2007; Gandhi et al., 2009; Behzadi e Aslaminejad, 2010; Ghazanfari et al., 2011; Pandorfi et al., 2011; Raja et al., 2012). Expandir a utilização dessa ferramenta para estimar uma importante biotecnologia reprodutiva aplicada no rebanho de bovinos, como a PIVE, pode gerar resultados importantes para pecuária do nosso país, além de abrir caminho para novas aplicações da inteligência artificial no âmbito da pesquisa científica.

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado para identificar e caracterizar as subpopulações espermáticas no sêmen criopreservado de touros Senepol; gerar um modelo estatístico para estimar a PIVE com base nas subpopulações espermáticas e demais atributos espermáticos analisados no citòmetro de fluxo, utilizando análise estatística multivariada; e aplicar a inteligência artificial, por meio do uso das RNAs com o intuito de melhorar a estimativa da PIVE.

2. Revisão de literatura

Na revisão de literatura a seguir são relatados os assuntos relevantes para a pesquisa de forma detalhada. Nas seções que seguem, os temas análise computadorizada do sêmen, análise das subpopulações espermáticas, análises no citômetro de fluxo, análise da morfologia espermática e estimativa da fertilidade são abordados de forma mais minuciosa.

2.1 Análise computadorizada do sêmen

A análise da motilidade espermática é uma importante ferramenta na seleção de um ejaculado, sendo a determinação da porcentagem de espermatozoides móveis o teste mais utilizado para predizer a qualidade seminal (Verstegen et al., 2002). Porém, quando mensurada microscopicamente, não apresenta boa correlação com a fertilização *in vivo* ou *in vitro*, pois além do erro humano durante sua avaliação subjetiva, ainda existe a limitação do método para avaliar detalhadamente as características da cinética espermática (Liu et al., 1991). A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é importante pelo fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (Farrell et al., 1998; Verstegen et al., 2002; Cox et al., 2006; Matos et al., 2008; Sellem et al., 2015; Del Olmo et al., 2013; Ahmed et al., 2016; Tremoen et al., 2018).

A análise computadorizada do sêmen (*Computer-assisted sperm analysis* – CASA) consolidou-se como um método aceito pela comunidade de reprodução animal, tanto para uso em unidades de produção, quanto para pesquisa, visto que esta análise gera informações importantes com relação às propriedades cinéticas de um ejaculado (Amann e Waberski, 2014). O CASA consiste em sistema automático (hardware e software) desenvolvido para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula, assim como de subpopulações de células espermáticas (Amann e Katz, 2004). O sistema de avaliação da motilidade espermática pelo CASA quantifica um grande número de células com padrão de motilidade heterogêneo em um curto período de tempo, além de fornecer outras informações como concentração de espermatozoides/mL, morfologia, motilidade e velocidade, detectando sutis mudanças nestes parâmetros (Farrell et al., 1996; Kraemer et al., 1998).

Para avaliação da motilidade propriamente dita, primeiramente cada imagem captada pela câmera acoplada ao microscópio é convertida em imagem digital, e a organização sequencial de diversas imagens digitais originam um filme. Cada conjunto de imagens captadas em diversos campos de observação da amostra

espermática são automaticamente analisadas (Stephens et al.,1988). O software reconhece as células e desenha para cada espermatozoide uma sequência completa do movimento de forma a reconstruir sua trajetória (Mortimer, 2000). Com o uso do CASA todos os espermatozoides em um campo de visão e suas trajetórias são reconstruídos simultaneamente, sendo que todas as células espermáticas de um campo são identificadas e avaliadas antes que as imagens do próximo campo, captadas na sequência, sejam analisadas (Stephens et al., 1988). As trajetórias obtidas são matematicamente processadas, permitindo a definição das trajetórias das células de forma numérica e os resultados desses processamentos são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozoide (Quintero-Moreno et al., 2003). É importante ressaltar que diferenças na espécie animal, câmara de avaliação, intensidade de iluminação, hardware e software de imagem, configurações do equipamento, técnico, entre outras variáveis, afetam a exatidão e precisão dos resultados (Amann e Waberski, 2014).

De acordo com Verstegen et al. (2002) os parâmetros fornecidos pelo CASA são: velocidade curvilinear (VCL- μm/s), que é a velocidade da trajetória real do espermatozoide, sendo sempre a maior das três velocidades e a que serve como elemento de cálculo para a linearidade; velocidade linear progressiva (VSL- μm/s), que é a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide, sendo sempre a mais baixa das três velocidades; velocidade média da trajetória (VAP- μm/s), que é a velocidade média da trajetória do espermatozoide; amplitude de deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH - μm), que é a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real, sendo esse um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização, pois sua mensuração relaciona-se com a capacidade de penetração na zona pelúcida do oócito; frequência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz), que é o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento, portanto, se existem mais batimentos por segundos que imagens por segundos, a BCF é subestimada; retilinearidade (STR - %), que é a relação percentual entre VSL e VAP, estimando a proximidade do percurso da célula a uma linha reta com correspondência de 100% à retilinearidade ideal; linearidade

(LIN - %), que é a relação percentual entre VSL e VCL, sendo que estima a proximidade do trajeto da célula de uma linha reta e WOB (%), que é o coeficiente de oscilação, calculado pela relação percentual entre VAP e VCL. Além desses parâmetros o CASA gera a porcentagem da população total de espermatozoides subdividida em quatro categorias de velocidade: rápidos, médios, lentos e estáticos (Kathiravan et al., 2011).

Com os resultados da cinética individual dos espermatozoides também é possível agrupá-los em diferentes subpopulações espermáticas após análises estatísticas de agrupamento, visto que a média ou mediana dos valores obtidos para a população total de espermatozoides muitas vezes são insuficientes para esclarecer os resultados dos estudos (Martínez-Pastor et al., 2011; Amann e Waberski, 2014). O uso do CASA para classificar diferentes subpopulações de espermatozoides oferece uma oportunidade para estabelecer diferentes critérios e aspectos funcionais dos espermatozoides relacionados à fertilidade (Kathiravan et al., 2011).

2.2 Análise das subpopulações espermáticas

A avaliação seminal sempre deve considerar o fato de que a população espermática é heterogênea entre indivíduos e entre ejaculados do mesmo indivíduo, sendo que essa heterogeneidade se dá sob diferentes aspectos (Holt e Van Look, 2004; Kanno et al., 2017). Há uma quantidade substancial de dados que apoiam o fato de que qualquer ejaculado mamífero é constituído por uma população heterogênea de espermatozoides, no qual subpopulações espermáticas, que diferem quanto aos padrões de motilidade coexistem (Abaigar et al., 1999; Quintero-Moreno et al., 2003; 2007; Martínez et al., 2006; Muiño et al., 2008a; Dorado et al., 2010; Bravo et al., 2011; Bergstein-Galan et al., 2017).

A origem das subpopulações espermáticas nos ejaculados ainda não é completamente clara. Há um interesse expressivo na hipótese de que elas refletem diferenças funcionais e também adaptativas das células e, se assim for, possivelmente elas se originam durante a espermatogênese, quando os efeitos genotípicos heterogêneos ainda podem afetar a qualidade das células de forma

individual (Abaigar et al., 1999). Outra hipótese levantada é a de que as subpopulações também podem representar espermatozoides provenientes de diferentes partes do epidídimo, embora essa seja menos provável (Abaigar et al., 2001).

O estudo das subpopulações espermáticas já foi realizado em diferentes espécies de mamíferos. Pesquisas com essa avaliação já foram realizadas em gazelas (Abaigar et al., 1999; Abaigar et al., 2001), javalis (Abaigar et al., 1999; Quintero-Moreno et al., 2004; Cremades et al., 2005; Rivera et al., 2005; 2006; Flores et al., 2008; 2009; Estrada et al., 2017), veados (Martinez-Pastor et al., 2005), garanhões (Quintero-Moreno et al., 2003), jumentos (Flores et al., 2008), cães (Núñez-Martínez et al., 2006; Dorado et al., 2011a; 2011b; Peña et al., 2012), gatos (Contri et al., 2012; Souza et al., 2018), coelhos (Quintero-Moreno et al., 2007), bodes (Barbas et al., 2018; Dorado et al., 2010; Vázquez et al., 2015), carneiros (Bravo et al., 2011; Santolaria et al., 2015; Yániz et al., 2015; Bergstein-Galan et al., 2017; Ledesma et al., 2017), búfalos (Maylem et al., 2017) e touros (Muiño et al., 2008a; 2008b; 2009; Ferraz et al., 2014; Kanno et al., 2017).

Mediante os resultados dos parâmetros cinéticos obtidos no CASA para cada espermatozoide em uma amostra de sêmen são aplicados diferentes procedimentos de análise multivariada de agrupamento para identificar e caracterizar as subpopulações e, posteriormente, são calculadas suas frequências (Martínez-Pastor et al., 2011). Em bovinos, Muiño et al. (2008a) identificaram quatro subpopulações: a subpopulação 1 é formada por aqueles espermatozoides com velocidade relativamente baixa (VCL, VSL e VAP médios), mas com alta progressividade (alta LIN, STR, WOB, BCF e baixa ALH); a subpopulação 2 contém espermatozoides altamente ativos mas não progressivos, o que pode configurar um movimento hiperativado, indicado por altos valores de VCL e ALH juntamente com baixos valores de LIN e STR, e moderado BCF; a subpopulação 3 inclui os que são pouco móveis e não progressivos, indicado por menores valores de VCL, VSL, VAP, ALH e BCF juntamente com menores valores de LIN, STR e WOB e a subpopulação 4 é representada pelos espermatozoides que se movem mais rápida e progressivamente, indicado por maiores valores de VCL, VSL, VAP e BCF juntamente com maiores valores de LIN, STR, WOB e moderada ALH.

Segundo Abaigar et al. (2001) é possível que os espermatozoides se desloquem de uma subpopulação para outra. Estes autores propõem que alguns espermatozoides ativos e progressivos que estão em uma determinada subpopulação, durante o armazenamento, convertem seus comportamentos para outras subpopulações que são constituídas por espermatozoides ativos, mas que não apresentam movimento progressivo, devido à perda de integridade e coordenação metabólica. Outra subpopulação de qualidade inferior, provavelmente represente os espermatozoides que estão em uma fase tardia de degeneração. A presença de uma subpopulação "rápida e linear" tem sido proposta como um bom indicador da qualidade da amostra, enquanto que uma subpopulação predominantemente "lenta e não-linear" seria um marcador de má qualidade (Martínez-Pastor et al., 2011).

Variações quanto às frequências das subpopulações já foram associadas a diferenças individuais entre os animais (Núnez-Martinez et al., 2006; Muiño et al., 2008b; Kanno et al., 2017) e entre ejaculados (Kanno et al., 2017). O processo de congelação e descongelação também altera a frequência das subpopulações (Núnez-Martínez et al., 2006; Dorado et al., 2011a; Muiño et al., 2008b; 2009; Maylem et al., 2017). Em touros, foi relatado que a variação encontrada é quase que exclusivamente estabelecida pela proporção da subpopulação que apresenta espermatozoides mais ativos e progressivos e que ejaculados que apresentam maior proporção desta subpopulação são mais resistentes à criopreservação, apresentando maior longevidade pós-descongelação (Muiño et al., 2008b).

Em relação à fertilidade, alguns autores sugerem que a subpopulação de espermatozoides com alta motilidade e progressivos são os mais adequados para fazer parte da população de fertilização. Quintero-Moreno et al. (2003), trabalhando com espermatozoides de garanhões, descobriram que ejaculados com alta fertilidade compartilhavam um padrão de subpopulação de espermatozoides rápidos e lineares. Em concordância, Yániz et al. (2015) relataram que a distribuição de subpopulações entre carneiros de alta e baixa fertilidade é diferente, sendo que maiores porcentagens de espermatozoides com movimentos rápidos e lineares é encontrada no grupo de alta fertilidade. Os resultados de Ferraz et al. (2014) parecem confirmar que os espermatozoides bovinos móveis e mais lineares

apresentam grande influência sobre a fertilidade, pois maior número destes espermatozoides apresentou ligação à zona pelúcida dos oócitos. Muiño et al. (2008a) relataram que se somente a subpopulação que apresenta espermatozoides mais rápidos e progressivos representa a capacidade de fertilização, apenas cerca de 20% dos espermatozoides descongelados teriam a capacidade de chegar ao sítio de fertilização. Entretanto, é possível que os espermatozoides relativamente lentos, mas que são progressivos, atribuídos a outra subpopulação, também sejam competentes, sendo selecionados durante o transporte do espermatozoide no trato genital feminino. Conforme sugerido por Ferraz et al. (2014) para predizer de forma mais correta a capacidade fertilizante de uma amostra de sêmen, bem como a importância das subpopulações espermáticas, uma combinação dos resultados dos vários métodos de avaliação do sêmen *in vitro* e *in vivo* deve ser realizada.

2.3 Análises no citômetro de fluxo

A citometria de fluxo é uma ferramenta poderosa em andrologia. Sua aplicação permite que milhares de espermatozoides sejam avaliados em um curto período de tempo, apresenta alta repetibilidade, reduz a subjetividade e permite a avaliação de múltiplos parâmetros e compartimentos simultaneamente em uma célula por meio do uso de diferentes sondas fluorescentes (Gillan et al., 2005; Peña et al., 2016). Esta técnica possibilita a contagem, classificação e o isolamento dos espermatozoides que, após serem marcados com as sondas fluorescentes de interesse, são movidos individualmente por meio de um sistema detector óptico em fluxo laminar para serem avaliados (Freitas-Dell'Aqua et al., 2009). Já está disponível um amplo número de análises que podem melhorar a estimativa da fertilidade dos espermatozoides por meio do uso das sondas fluorescentes, como: avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, do potencial mitocondrial, do status oxidativo, do DNA, entre outras (Arruda et al., 2007; Celeghini et al., 2007; Silva e Guerra, 2012; Castro et al., 2016; Kumaresan et al., 2017).

A integridade das membranas plasmática e acrossomal tem sido considerada como marcador relevante para a capacidade de fertilização (Flesch e Gadella, 2000; Januskaukas e Zilinkas, 2002; García-Alvarez et al., 2014). A integridade destas

membranas é importante para que diferentes processos fisiológicos relacionados à fertilização ocorram, como: capacitação espermática, reação acrossomal, hiperativação, ligação à zona pelúcida do oócito e fusão dos gametas (Flesch e Gadella, 2000; Maziero et al., 2009).

Para análise da integridade da membrana plasmática podem ser utilizadas sondas fluorescentes não penetrantes nas membranas íntegras, as quais somente penetram nas células com membrana plasmática danificada e, por possuírem afinidade ao DNA, ligam-se a ele e emitem sua fluorescência (Silva e Gadella, 2006; Silva et al., 2009). A sonda iodeto de propídio (IP) apresenta essa característica e emite fluorescência vermelha, sendo uma das sondas mais utilizada nos estudos em bovinos (Garner et al., 1986; Pintado et al., 2000; Alm et al., 2001; Celeghini et al., 2007; 2008; Jena et al., 2014; Campanholi et al., 2017; Kumaresan et al., 2017).

A análise da integridade da membrana acrossomal pode ser avaliada por diferentes métodos, mas o método mais comum utiliza marcadores de glicoproteínas, como lecitinas vegetais marcadas com diferentes sondas fluorescentes. A aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) é uma aglutinina de ervilha que se liga a glicoproteínas específicas da membrana acrossomal (α-manose e α-galactose), porém ela não consegue penetrar em membrana acrossomal intacta. Apenas os espermatozoides reagidos ou com alguma lesão no acrossoma são corados em verde-amarelo (Cross et al., 1986; Graham, 2001; Gillan et al., 2005; Celeghini et al., 2007). Diversos trabalhos em bovinos utilizaram essa sonda para avalição da integridade acrossomal (Graham et al., 1990; Arruda e Celeghini, 2003; Samardzija et al., 2006; Celeghini et al., 2007; 2008; Jena et al., 2014; Campanholi et al., 2017).

As mitocôndrias estão dispostas helicoidalmente na peça intermediária dos espermatozoides e desempenham função com relação ao seu estado energético produzindo ATP celular, matriz energética para os batimentos flagelares, além de estar relacionada à fertilidade (Freitas-Dell'Aqua et al., 2009; Kasai et al., 2002; Hu et al., 2009). Várias sondas fluorescentes podem ser usadas para avaliar a função mitocondrial do espermatozoide, como a Rodamina 123, MitoTracker green FM e JC-1 (Angrimani et al., 2015). Garner et al. (1997) verificaram que o JC-1 apresentou maior sensibilidade para avaliar o potencial da membrana mitocondrial quando

comparado às sondas Mito Tracker Green e Rodamina 123 em amostras de sêmen bovino criopreservadas. O JC-1 é uma sonda que altera suas propriedades fluorescentes devido a alteração na polarização da membrana mitocondrial interna (Silva e Gadella, 2006). Por ser dependente do gradiente eletroquímico, esta sonda precisa de potencial de membrana mitocondrial altamente negativo para penetrar na organela e emitir fluorescência nos comprimentos de onda de luz vermelha ou verde, de acordo com sua concentração interna final. Em altas concentrações, a sonda apresenta-se na forma de J-agregados e emite coloração vermelha-alaranjada, caracterizando mitocôndrias funcionais com potencial de membrana mitocondrial altamente negativo, enquanto que em concentrações baixas encontra-se na forma de monômero e emite coloração verde (Arruda et al., 2007).

Outra análise espermática que pode ser feita por citometria de fluxo é a avaliação do status oxidativo. Embora pequenas quantidades de espécies reativas ao oxigênio sejam necessárias para o funcionamento normal dos espermatozoides, concentrações desproporcionais afetam negativamente a qualidade das células espermáticas e prejudicam sua capacidade de fertilização (Agarwal et al., 2014). Em estudo de Simões et al. (2013) que avaliou o efeito do estresse oxidativo na PIVE em bovinos, foi relatado que a susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo compromete a integridade do DNA espermático e reduz a qualidade do embrião, pois reduz a taxa de clivagem e aumenta o número de células apoptóticas nos embriões que atingem o estágio de blastocisto. Diferentes sondas podem ser usadas para avaliar o status oxidativo dos espermatozoides, visto que elas se acumulam intracelularmente e se tornam fluorescentes após a oxidação. Algumas sondas detectam moléculas específicas de espécies reativas ao oxigênio, enquanto outras são inespecíficas (Martínez-Pastor et al., 2010). Um método recente de avalição do status oxidativo em espermatozoides bovinos foi validado em estudo de Castro et al. (2016). Esses autores observaram que a sonda CellROX green mostrou-se mais sensível e eficiente quando comparado ao uso da sonda H_2DCFDA (2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate), sendo uma sonda fluorescente que penetra na célula e, quando oxidada por radicais livres intracelulares, liga-se ao DNA, emitindo fluorescência verde mais intensa.

A integridade do material genético é essencial para a reprodução, visto que os eventos relacionados à fecundação e ao desenvolvimento embrionário dependem da sua integridade (Bochenek et al., 2001; Evenson, 2016). Espermatozoides com desenvolvimento normal da estrutura da cromatina tem seu DNA totalmente resistente à desnaturação, contudo o DNA dos espermatozoides que apresentam estrutura anormal da cromatina é suscetível à desnaturação. O estado do DNA dos espermatozoides pode ser determinado usando as propriedades metacromáticas da sonda laranja de acridina no ensaio de estrutura da cromatina espermática (*Sperm Chromatin Structure Assay*, SCSA®). Quando o DNA de fita dupla está íntegro a sonda se intercala entre os ácidos nucleicos e fluoresce em verde e quando a célula apresenta DNA de fita simples, ou seja, desnaturado, o laranja de acridina se intercala aos grupos fosfatos das fitas simples e fluoresce em vermelho (Gillan et al., 2005; Alves et al., 2015). O SCSA já mostrou apresentar relação com a fertilidade em touros (Ballachey et al., 1988; Bochenek et al., 2001; Waterhouse et al., 2006; García-Macías et al., 2007; Kumaresan et al., 2017).

2.4 Análise da morfologia espermática

Na avaliação de rotina, geralmente as características morfológicas dos espermatozoides são analisadas por meio de duas técnicas: esfregaços corados em microscópio de campo claro e técnica de preparação úmida. A técnica de preparação úmida não utiliza qualquer tipo de corante, então ela deve ser realizada com microscopia capaz de destacar os contornos celulares, como microscopia de contraste de fase ou microscopia de contraste de interferência diferencial (*Differential interference contrast*, DIC). Além disso, existem sistemas automatizados que realizam análises de morfologia espermática, como a análise computadorizada da morfometria espermática (*Assisted sperm morphometry analysis*, ASMA; Freitas Dell'Aqua et al., 2009; Arruda et al., 2011; Freneau, 2011).

As alterações morfológicas dos espermatozoides podem ser classificadas de diferentes formas, mas em todas os valores são expressos em porcentagem. A classificação que é feita com base na origem da alteração define as patologias em defeitos primários quando ocorrem no epitélio seminífero durante a

espermatogênese, defeitos secundários quando ocorrem durante o armazenamento e processo de maturação e defeitos terciários que ocorrem após a liberação do espermatozoide, incluindo os que ocorrem pela manipulação após a ejaculação. Outra classificação associa a patologia ao grau de importância do defeito para a fertilidade, de forma que defeitos maiores são aqueles relacionados com infertilidade e doenças testiculares e defeitos menores são aqueles que apresentam menor impacto na fertilidade, sendo que no resultado do espermograma devem ser considerados os percentuais de defeitos maiores, menores e defeitos totais. Outra classificação propõe dividir as patologias de acordo com a forma que podem diminuir a fertilidade: defeitos compensáveis, que são aqueles que interferem desde o transporte e função dos espermatozoides no trato genital feminino até o início da fertilização e bloqueio da polispermia e os defeitos não compensáveis que são aqueles que interferem fundamentalmente na fertilização e início do desenvolvimento embrionário (Blom, 1973; Saacke, 2008; Freneau, 2011).

A análise da morfologia espermática permite a identificação de touros com baixo potencial de fertilidade e alguns trabalhos relatam que a proporção de espermatozoides com morfologia normal no ejaculado de um touro está relacionada à sua fertilidade (Johnson, 1997; Januskauskas e Zilinskas, 2002; Al-Makhzoomi et al., 2008; Nagy et al., 2013). Em estudo realizado por Philips et al. (2004) foi relatado que a morfologia espermática avaliada no sêmen de touros pós-descongelação apresentou correlação significativa com a taxa de concepção após inseminação artificial (IA), sendo possível concluir que as melhores equações preditivas encontradas foram derivadas dos resultados referentes à morfologia espermática, permitindo identificar os touros com maior ou menor potencial de fertilidade.

2.5 Estimativa da fertilidade

Com relação ao uso das RNAs para estimar a fertilidade, somente estudos em humanos foram encontrados com a aplicação desta metodologia. Segundo Milewski et al. (2013), um modelo criado com o uso das RNAs prediz corretamente cerca de 70% das gestações. Outro estudo observou que o uso das RNAs permitiu precisão de 73% nos resultados em relação à taxa de sucesso do tratamento de

fertilização *in vitro* (FIV) a partir de 27 atributos obtidos de resultados laboratoriais (Durairaj e Thamiselvan, 2013). Em trabalho de Milewski et al. (2009) foi relatado que com a ajuda das RNAs é possível prever a falha de tratamentos reprodutivos com quase 90% de probabilidade de certeza nos pacientes. Neiderberger et al. (1993) relataram que com essa ferramenta foi possível classificar corretamente 67,8% dos resultados obtidos no ensaio de penetração em oócitos de hamster sem zona pelúcida e 80% dos resultados obtidos no ensaio de penetração em muco cervical bovino, sugerindo que esse método de análise de dados pode ser usado com sucesso para prever o potencial de fertilidade por meio da avaliação do sêmen em homens. Estudo de Siristatidis et al. (2016) propôs um modelo funcional de previsão da FIV em humanos, com o uso das RNAs, para auxiliar os médicos a adaptarem o tratamento de casais subférteis e melhorar o resultado da reprodução assistida.

Em animais, já foi relatado que são necessárias diversas avaliações de diferentes características do espermatozoide para refletir a capacidade real de fertilização de uma amostra de sêmen (Rodríguez-Martínez, 2003; Kastelic e Thundathil, 2008; Oliveira et al., 2013). Diferentes atributos da estrutura espermática são fundamentais para ocorrência de processos relacionados à fertilidade, especialmente na PIVE (Muller, 2000; Tartaglione e Ritta, 2004; Mehmood et al., 2009; Arruda et al., 2013).

Alguns estudos consideram a PIVE uma biotecnologia reprodutiva adequada para a previsão do desempenho da fertilidade em touros (Zhang et al., 1997; Larsson e Rodríguez-Martínez, 2000). Diferentes trabalhos já relataram correlações positivas entre a PIVE e a fertilidade *in vivo* em bovinos (Lonergan, 1994; Larsson e Rodríguez-Martínez, 2000; Ward et al., 2001; Sudano et al., 2011). Entretanto, é importante relatar que outras pesquisas não garantem que os resultados obtidos *in vitro* retratam as mesmas respostas a campo (Vandaele et al., 2006; Utt, 2016, Puglisi et al., 2004).

Variações na qualidade seminal identificadas por diferentes técnicas laboratoriais explicam parte da variação da fertilidade na PIVE, sendo que diferentes conjuntos de variáveis associadas à estrutura da membrana plasmática e função espermática podem ser usados para identificar variações intrínsecas às taxas de

clivagem e de desenvolvimento embrionário (Arruda et al., 2013). Nenhuma técnica de avaliação isoladamente apresenta sensibilidade suficiente para a determinação da fertilidade. A combinação de diversos métodos de análise espermática tem agregado maior precisão para a estimativa do potencial de fertilização das amostras de sêmen bovino (Rodríguez-Martínez, 2003; Maziero et al., 2009; Celeghini et al., 2017).

Agregar à avaliação subjetiva e demorada de centenas de espermatozoides para obter concentração, motilidade e morfologia da amostra, a análise computadorizada da cinética espermática e o uso da citometria de fluxo para analisar vários atributos de milhares de células em segundos, aumenta a acurácia da avaliação da qualidade do sêmen e do seu potencial de fertilidade (Vincent et al., 2012). A avaliação da qualidade dos espermatozoides descongelados usando CASA e citometria de fluxo pode fornecer previsão razoável da fertilidade do sêmen bovino (Sellem et al., 2015; Gliozzi et al., 2017).

3. Referências

Abaigar T, Cano M, Pickard AR, Holt WV (2001) Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and sort term semen storage. **Reproduction** 122:265-273.

Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, Del Barrio G (1999) Sperm subpopulations in boar (*Sus Scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. **Biology of Reproduction** 60:32-41.

ABCB Senepol. Associação Brasileira dos Criadores de Bovinos Senepol. **Associados**, 2019a. Disponível em: http://senepol.org.br/associacao/associados/. Acesso em: 06 de agosto de 2019.

ABCB Senepol. Associação Brasileira dos Criadores de Bovinos Senepol. **Rebanho registrado de Senepol cresce no Brasil**, 2019b. Disponível em: http://senepol.org.br/rebanho-registrado-de-senepol-cresce-no-brasil/. Acesso em: 06 de agosto de 2019.

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Perfil da Pecuária no Brasil**, 2019. Disponível em: http://www.abiec.com.br/controle/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf. Acesso em: 08 de agosto de 2019.

Agarwal A, Virk G, Ong C, Plessis SS (2014) Effect of oxidative stress on male reproduction. **The World Journal of Men's Health** 32:1-17.

Ahmed H, Andrabi SMH, Jahan S (2016) Semen quality parameters as fertility predictors of water buffalo bull spermatozoa during low-breeding season. **Theriogenology** 86:1516-1522.

Al-Makhzoomi A, Lundeheim N, Håård M, Rodríguez-Martínez H (2008) Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. **Theriogenology** 70:682-691.

Alm K, Taponen J, Dahlbom M, Tuunainen E, Koskinen E, Andresson M (2001) A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. **Theriogenology** 56:677-684.

Alves MBR, Oliveira ML, Lançoni R, Florez-Rodriguez SA, Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC (2015) Investigando a fragmentação não induzida e a susceptibilidade à fragmentação do DNA espermático: refinamento da avaliação espermática. Parte 2. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 39:309-314.

Amann RP, Katz DF (2004) Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology** 25:317-325.

Amann RP, Waberski D (2014) Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology** 81:5-17.

Angrimani DSR, Losano JDA, Rui BR, Bicudo LC, Andrade AFC, Arruda RP, Celeghini ECC (2015) Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 39:277-283.

Arruda RLP, Zúccari CESN, Fernandes CE, Abreu UGP, Costa e Silva EV (2013) Características do sêmen congelado relacionadas à fertilidade *in vitro* em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 37:72-80.

Arruda RP, Andrade AFC, Peres KR, Raphael CF, Nascimento J, Celeghini ECC (2007) Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 31:8-16.

Arruda RP, Celeghini ECC (2003) Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae Suplemento**, 31:230-231.

Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaimes JD (2011) Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 35:145-151.

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **INDEX ASBIA 2017**, 2017. Disponível em: https://www.asbia.org.br/wp-content/uploads/2018/10/INDEX-ASBIA-2017_completo.pdf. Acesso em: 06 de agosto de 2019.

Ballachey BE, Evenson DP, Saacke RG (1988) The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. **Journal of Andrology** 9:109-15.

Barbas JP, Leahy T, Horta AE, García-Herreros M (2018) Sperm kinematics and subpopulational responses during the cryopreservation process in caprine ejaculates. **Cryobiology** 82:137-147.

Behzadi MRA, Aslaminejad AA (2010) A comparison of neural network and nonlinear regression predictions of sheep growth. **Journal of Animal and Veterinary Advances** 9:2128–2131.

Bergstein-Galan TG, Weiss RR, Kozicki LE, Bicudo SD (2017) Sperm subpopulations in ejaculated sperm and spermatozoa recovered from ovine epididymides up to 48 h after death. **Animal Reproduction Science** 187:20-27.

Bergstein TG, Weiss RR, Bicudo SD (2014) Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 38:189-194.

Blom E (1973) The ultrastructure of some characteristic sperm deffects and a proposal for a new classification of the bull spermiogram. **Nordisk Veterinaermedicin** 25:383-339.

Bochenek M, Smorag Z, Pilch J (2001) Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. **Theriogenology** 56:557-567.

Bravo JA, Montanero J, Calero R, Roy TJ (2011) Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. **Animal Reproduction Science** 129:22-29.

Campanholi SP, Monteiro FM, Dias EAR, Mercadante MEZ, Paz CCP, Dell'Aqua Junior JA, Papa FO, Dell'Aqua CPF, Vantini R, Garcia JM (2017) Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and *in vitro* fertility. **Theriogenology** 89:114-121.

Castro LS, Assis PM, Siqueira AFP, Hamilton TRS, Mendes CM, Losano JDA, Nichi M, Visintin JA, Assumpção MEOA (2016) Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model a new and more sensitive oxidative status evaluation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2016:1-12.

Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF (2007) Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals** 42: 479-488.

Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM (2008) Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science** 104:119-131.

Celeghini ECC, Arruda RP, Florez-Rodriguez SA, Santos FB, Alves MBR, Oliveira BMM (2017) Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 41:40-45.

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **PIB do agronegócio brasileiro**, 2018. Disponível em: https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx. Acesso em: 05 de agosto de 2019.

Contri A, Zambelli D, Faustini M, Cunto M, Gloria A, Carluccio A (2012) Artificial neural networks for the definition of kinetic subpopulations in electroejaculated and epididymal spermatozoa in the domestic cat. **Reproduction** 144:339-347.

Cox JF, Alfaro V, Montenegro V, Rodriguez-Martinez H (2006) Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology** 66:860-867.

Cremades T, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Abaigar T, Vázquez JM, Martínez EA (2005) Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. **Journal of Andrology** 26:610-618.

Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW (1986) Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Research** 15:213-226.

Del Olmo E, Bisbal A, Maroto-Morales A, García-Alvarez O, Ramon M, Jimenez-Rabadan P, Martínez-Pastor F, Soler AJ, Garde JJ, Fernandez-Santos MR (2013) Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. **Animal Reproduction Science** 138:102-109.

Dorado J, Molina I, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M (2010) Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. **Theriogenology** 74:795-804.

Dorado J, Alcaráz L, Duarte N, Portero JM, Acha D, Hidalgo M (2011a) Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. **Animal Reproduction Science** 125:211-218.

Dorado J, Gálvez JMJ, Murabito MR, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M (2011b) Identification of sperm subpopulations in canine ejaculates: Effects of cold storage and egg yolk concentration. **Animal Reproduction Science** 127:106-113.

Durairaj M, Thamiselvan P (2013) Applications of artificial neural network for IVF data analysis and prediction. **Journal of Engineering, Computers & Applied Sciences** 2:11-15.

El-Aziz AHA, Mahrous UE, Kamel SZ, Sabek AA (2016) Factors influencing *in vitro* production of bovine embryos: a review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances** 11:737-756.

Estrada E, Álamo MMR, Rodríguez-Gil JE, Yeste, M (2017) The addition of reduced glutathione to cryopreservation media induces changes in the structure of motile subpopulations of frozen-thawed boar sperm. **Cryobiology** 78:56-64.

Evenson DP (2016) The sperm chromatin structure assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. **Animal Reproduction Science** 169:56-75.

Farrell PB, Foote RH, McArdle MM, Trouern-Trend VL, Tardif AL (1996) Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Andrology** 17:293-300.

Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH (1998) Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology** 49:871-879.

Fernandez C, Soria E, Sanchez-Seiquer P, Gómez-Chova L, Magdalena R, Martín JD, Navarro MJ, Serrano AJ (2007) Weekly milk prediction on dairy goats using neural networks. **Neural Computing and Applications** 16:373–381.

Ferraz MAMM, Morató R, Yeste M, Arcarons N, Pena AI, Tamargo C, Hidalgo CO, Muiño R, Mogas T (2014). Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to *in vitro* sperm–oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. **Theriogenology** 81:1067-1072.

Flesch FM, Gadella BM (2000) Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta** 1469:197-235.

Flores E, Taberner E, Rivera MM, Peña A, Rigau T, Miró J, Rodríguez-Gil JE (2008) Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. **Theriogenology** 70:936-945.

Flores E, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE (2009) The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. **Theriogenology** 72:784-797.

Freitas-Dell'Aqua CP, Crespilho AM, Papa FO, Dell'Aqua Junior JA (2009) Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 33:213-222.

Freneau GE (2011) Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 35:160-170.

Gallego V, Cavalcante SS, Fujimoto RY, Carneiro PCF, Azevedo HC, Maria AN (2017) Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Theriogenology** 87:16-24.

Gandhi RS, Raja TV, Ruhil AP, Kumar A (2009) Prediction of lifetime milk production using artificial neural network in Sahiwal cattle. **Indian Journal of Animal Sciences** 79:1038-1040.

García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Ramón M, Olmo E, Jiménez-Rabadán P, Fernández-Santos MR, Anel-López L, Garde JJ, Soler AJ (2014) Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support *in vitro* capacitation and fertilization. **Reproduction, Fertility and Development** 26:725-732.

García-Macías V, Paz P, Martinez-Pastor F, Álvarez M, Gomes-Alves S, Bernardo J, Anel E, Anel L (2007) DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm–Bos–Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. **International Journal of Andrology** 30:88-98.

Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM (1986) Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction** 34:127-138.

Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, Dejarnette JM, Marshall CE (1997) Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction** 57:1401-1406.

Ghazanfari S, Nobari K, Tahmoorespur M (2011) Prediction of egg production using artificial neural network. **Iranian Journal of Applied Animal Science** 1:11–16.

Gillan L, Evans G, Maxwell WMC (2005) Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology** 63:445-457.

Gliozzi TM, Turri F, Manes S, Cassinelli C, Pizzi F (2017) The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. **Animal** 11:1975-1982.

Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH (1990) Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow citometry. **Biology of Reproduction** 43:55-64.

Graham JK (2001) Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science** 68:239-247.

Grzesiak W, Lacroix R, Wójcik J, Blaszczyk P (2003) A comparison of neural network and multiple regression predictions for 305-day lactation yield using partial lactation records. **Canadian Journal of Animal Science** 83:307–310.

Holt WV, Van Look KJW (2004) Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. **Reproduction** 127:527-535.

Hu Y, Xia X, Pan L, Lu N, Wu Y, Zhou X, Shang X, Cui Y, Huang Y (2009) Evaluation of sperm mitochondrial membrane potential in varicocele patients using JC-1 fluorescent staining. **National Journal of Andrology** 15:792-795.

Jena SC, Kumar S, Rajput S, Roy B, Verma A, Kumaresan A, Mohanty T, De S, Kumar R, Datta TK (2014) Differential methylation status of IGF2-H19 Locus does not affect the fertility of crossbreed bulls but some of the CTCF binding sites could be potentially important. **Molecular Reproduction and Development** 81:350-362.

Januskauskas A, Zilinskas H (2002) Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. **Veterinarija ir Zootechnika** 39:1-8.

Johnson W (1997) The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. **Veterinary Clinics of North America**: **Food Animal Practice** 13:255-270.

Kanno C, Sakamoto KQ, Yanagawa Y, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M (2017) Comparison of sperm subpopulation structures in first and second ejaculated semen from Japanese black bulls by a cluster analysis of sperm motility evaluated by a CASA system. **The Journal of Veterinary Medical Science** 79:1359-1365.

Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K (2002) Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. **Asian Journal of Andrology** 4:97–103.

Kastelic JP, Thundathil JC (2008) Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals** 43:368-373.

Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G (2011) Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system – a review. **Reproduction in Domestic Animals** 46:165-172.

Kraemer M, Fillion C, Martin-Pont B, Auger J (1998) Factors influencing human sperm kinematic measuring by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. **Human Reproduction** 13:611-619.

Kumaresan A, Johannisson A, Al-Essawe EM, Morrell JM (2017) Sperm viability, reactive oxygen species, and DNA fragmentation combined can discriminated between above- and below-average fertility bulls. **Journal of Dairy Science** 100:5824-5836.

Larsson B, Rodríguez-Martínez H (2000) Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science** 60-61:327-336.

Ledesma A, Zalazar L, Fernández-Alegre E, Hozbor F, Cesari A, Martínez-Pastor F (2017) Seminal plasma proteins modify the distribution of sperm subpopulations in cryopreserved semen of rams with lesser fertility. **Animal Reproduction Science** 184:44-50.

Liu DY, Clarke GN, Baker WG (1991) Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates *in vitro*. **Journal of Andrology** 12:231-239.

Lonergan P (1994) The application of *in vitro* fertilization techniques to the prediction of bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals** 29:12-21.

Martínez IN, Morán JM, Pena FJ (2006) Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. **Journal of Andrology** 27:596-603.

Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Herraez P, Anel L, Paz P (2005) Sperm subpopulations in Iberian Red Deer epididymal sperm and their changes though the cryopreservation process. **Biology of Reproduction** 72:316-327.

Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel L, Paz P (2010) Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. **Reproduction in Domestic Animals** 45:67-78.

Martínez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L, Paz P (2011) Statistical series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. **Theriogenology** 75:783-95.

Matos DL, Araújo AA, Roberto IG, Toniolli R (2008) Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 32:225-232.

Maylem ERS, Leoveras EDC, Venturina EV, Atabay EP, Atabay EC (2017) Subpopulation structure and changes after cryopreservation of sperms from high and low fertility water buffalo. **Journal of Veterinary Andrology** 2:68-76.

Maziero RRD, Crespilho AM, Freitas-Dell'Aqua CP, Dell'Aqua Junior JA, Papa FO (2009) Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 6:5-10.

Mehmood A, Anwar M, Saqlan Naqvi SM (2009) Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. **Animal Reproduction Science** 111:141-148.

Milewski R, Jamiołkowski J, Milewska Anna J, Domitrz J, Szamatowicz J, Wołczyński S (2009) Prognosis of the IVF ICSI/ET procedure efficiency with the use of artificial neural networks among patients of the Department of Reproduction and Ginecological Endocrinology. **Ginekologia Polska** 80:900-906.

Milewski R, Milewska AJ, Wiesak T, Morgan A (2013) Comparison of artificial neural networks and logistic regression analysis in pregnancy prediction using the *in vitro* fertilization. **Studies in Logic, Grammar and Rhetoric** 35:39-48.

Mortimer ST (2000) Casa-Practical aspects. **Journal of Andrology** 21:515-524.

Muiño R, Peña AI, Rodríguez A, Tamargo C, Hidalgo CO (2009) Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. **Theriogenology** 72:860-868.

Muiño R, Rivera MM, Rigau T, Rodriguez-Gil JE, Peña AI (2008a) Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. **Animal Reproduction Science** 109:50-64.

Muiño R, Tamargo C, Hidalgo CO, Peña AI (2008b) Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science** 109:27-39.

Muller CH (2000) Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests. **Journal of Andrology** 21:10-30.

Nagy S, Johannisson A, Wahlsten T, Ijäs R, Andersson M, Rodriguez-Martinez H (2013) Sperm chromatin structure and sperm morphology: their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. **Theriogenology** 79:1153-1161.

Núñez-Martínez I, Moran JM, Peña FJ (2006) A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: Changes after cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals** 41:408-15.

Okamura V (2015) **Estrutura genética da raça Senepol no Brasil por meio de análise de pedigree**. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

Oliveira LZ, Arruda RP, Andrade AFC, Celeghini ECC, Reeb PD, Martins JPN, Santos RM, Beletti ME, Peres RFG, Monteiro FM, Hossepian de Lima VFM (2013) Assessment of *in vitro* sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal Reproduction Science** 137:145-155.

Pandorfi H, Silva IJO, Sarnighausen VCR, Vieira FMC, Nascimento ST, Guiselini C (2011) Uso de redes neurais artificiais para predição de índices zootécnicos nas fases de gestação e maternidade na suinocultura. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40:676-681.

Peña AI, Barrio M, Becerra JJ, Quintela LA, Herradón PG (2012) Motile sperm subpopulations in frozen–thawed dog semen: Changes after incubation in capacitating conditions and relationship with sperm survival after osmotic stress. **Animal Reproduction Science** 133:214-223.

Peña FJ, Muñoz PM, Ferrusola CO (2016) Flow cytometry probes to evaluate stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science** 43:S23-S28.

Phillips NJ, Mcgowan MR, Johnston SD, Mayer DG (2004) Relationship between thirty post-thaw spermatozoa characteristics and field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. **Animal Reproduction Science** 81:47-61.

Pintado B, de la Fuente J, Roldan ERS (2000) Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or the eosin: accuracy in the assessment of cell viability. **Journal of Reproduction and Fertility** 118:145-152.

Puglisi R, Balduzzi D, Galli A (2004) *In vitro* sperm penetration speed and its relationship with *in vivo* bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals** 39:424-428.

Quintero-Moreno A, Miró J, Teresa Rigau AT, Rodríguez-Gil JE (2003) Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology** 59:1973-1990.

Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE (2007) Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. **Reproduction in Domestic Animals** 42:312-319.

Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE (2004) Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. **Theriogenology** 61:673-690.

Raja TV, Ruhil AP, Gandhi RS (2012) Comparison of connectionist and multiple regression approaches for prediction of body weight of goats. **Neural Computing and Applications** 21:119-124.

Rivera MM, Quintero-Moreno A, Barrera X, Palomo MJ, Rigau T, Rodriguez-Gil JE (2005) Natural Mediterranean photoperiod does not affect the main parameters of boar-semen quality analysis. **Theriogenology** 64:934-946.

Rivera MM, Quintero-Moreno A, Barrera X, Rigau T, Rodriguez-Gil JE (2006) Effects of constant, 9 and 16-h light cycles on sperm quality, semen storage ability and motile sperm subpopulations structure of boar semen. **Reproduction in Domestic Animals** 41:386-393.

Rodriguez-Martinez H (2003) Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals** 38:312-318.

Rodríguez-Martínez H (2013) Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. **Animal Reproduction** 10:148-159.

Saacke RG (2008) Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. **Theriogenology** 70:473-478.

Samardzija M, Karadjole M, Getz I, Makek Z, Cergolj M, Dobranic T (2006) Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology** 4:58.

Santolaria P, Vicente-Fiel S, Palacín I, Fantova E, Blasco ME, Silvestre MA, Yániz JL (2015) Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. **Animal Reproduction Science** 163:82-88.

Sellem E, Broekhuijse MLWJ, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen EPC (2015) Use of combinations of *in vitro* quality assessments to predict fertility of bovine semen. **Theriogenology** 84:1447-1454.

Silva ECB, Guerra MMP (2012) Sondas fluorescentes: um avanço na avaliação da integridade estrutural e funcional de espermatozoides. **Revista de Ciências Agroveterinárias** 11:162-169.

Silva PFN, Gadella BM (2006) Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology** 65:958-978.

Silva SV, Batista AM, Coleto ZF, Guerra MMP (2009) Diferentes Métodos e técnicas na avaliação espermática: uma breve revisão. **Ciência Veterinária nos Trópicos** 12:1-15.

Simões R, Feitosa WB, Siqueira AFP, Nichi M, Paula-Lopes FF, Marques MG, Peres MA, Barnabe VH, Visintin JA, Assumpção MEO (2013) Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo *in vitro* development outcome. **Reproduction** 146:433-441.

Souza AK, Trautwein LGC, Paranzini CS, Perecin FM, Cardoso GS, Martins MIM. (2018) Influence of cooling temperature in sperm subpopulations of domestic cats. **Animal Reproduction Science** 189:1-10.

Stephens DT, Hickman R, Hoskins DD (1988) Description, validation, and performance characteristics of a new computer-automated sperm motility analysis system. **Biology of Reproduction** 38:577-586.

Sudano MJ, Crespilho AM, Fernandes CB, Martins Junior A, Papa FO, Rodrigues J, Machado R, Landim-Alvarenga FC (2011) Use of bayesian inference to correlate *in vitro* embryo production and *in vivo* fertility in zebu bulls. **Veterinary Medicine International** 2011:1-6.

Tartaglione CM, Ritta MN (2004) Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology** 62:1245-1252.

Tremoen NH, Gaustad AH, Andersen-Ranberg I, Van Son M, Zeremichael TT, Frydenlund K, Grindflek E, Vage DI, Myromslien FD (2018) Relationship between sperm motility characteristics and ATP concentrations, and association with fertility in two different pig breeds. **Animal Reproduction Science** 193:226-234.

USDA. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**, 2019. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf. Acesso em: 05 de agosto de 2019.

Utt MD (2016) Prediction of bull fertility. **Animal Reproduction Science** 169:37-44.

Vandaele L, Mateusen B, Maes D, Kruif A, Van Soom A (2006) Is apoptosis in bovine *in vitro* produced embryos related to early developmental kinetics *and in vivo* bull fertility? **Theriogenology** 65:1691-1703.

Vázquez AJF, Cedillo MJ, Quezada VJ, Rivas AC, Morales ECL, Ayala EME, Hernández MJ, González RA, Aragón MA (2015) Effects of repeated electroejaculations on kinematic sperm subpopulations and quality markers of Mexican creole goats. **Animal Reproduction Science** 154:29-38.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K (2002) Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology** 57:149-179.

Viana JHM (2018) A produção de embriões bovinos em 2017: O mercado em stand-by. **O embrião** 62:6-10.

Vincent P, Underwood SL, Dolbec C, Bouchard N, Kroetsch T, Blondin P (2012) Bovine semen quality control in artificial inseminations centers. **Animal Reproduction** 9:153-165.

Ward F, Rizos D, Corridan D, Quinn K, Boland M, Lonergan P (2001) Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility *in vivo*. **Molecular Reproduction and Development** 60:47-55.

Waterhouse KE, Haugan T, Kommisrud E, Tverdal A, Flatberg G, Farstad W, Evenson DP, Angelis PM (2006) Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. **Reproduction, Fertility and Development** 18:781-788.

Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, RodriguezMartinez H (1997) Relationship between embryo development *in vitro* and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. **Theriogenology** 48:221-231.

Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Sánchez-Nadal JA, Santolaria P (2015) Sperm population structure in high and low field fertility rams. **Animal Reproduction Science** 156:128-134.

CAPÍTULO 2 – Estimativa da produção *in vitro* de embriões com base nas subpopulações espermáticas em touros Senepol[1]

RESUMO - Para obter maior acurácia sobre a estimativa da fertilidade de um ejaculado, diferentes atributos espermáticos devem ser avaliados. O fato da população de espermatozoides ser heterogênea em um ejaculado é amplamente aceita pela comunidade científica e tem sido extensivamente estudada na última década. Aliar a avaliação das subpopulações espermáticas com análise de outros atributos espermáticos pode ajudar a melhorar a estimativa da fertilidade em bovinos. Diante disso, os objetivos do presente estudo foram: 1) identificar e caracterizar as subpopulações espermáticas no sêmen criopreservado de touros Senepol após processo de lavagem realizado antes da fertilização *in vitro* e 2) determinar um modelo para estimar a produção *in vitro* de embriões (PIVE) com base nas subpopulações espermáticas em conjunto com outras análises de qualidade espermática. Trinta e oito doses comerciais de sêmen de touros Senepol, escolhidas com base em dados retrospectivos de 386 rotinas de PIVE, passaram por lavagem do sêmen e foram avaliadas pelo sistema CASA (*Computer-assisted sperm analysis*). Pela técnica de preparação úmida foi avaliada também a morfologia espermática e por citometria de fluxo foram realizadas análises de integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, status oxidativo e resistência da cromatina. Após análises multivariadas de componentes principais e agrupamento foram identificadas três subpopulações espermáticas: SBP1 (movimento rápido e progressivo), SBP2 (movimento hiperativado) e SBP3 (movimento lento e não progressivo). Foi aplicada análise de regressão logística para associar os resultados das subpopulações e demais variáveis de qualidade espermática com a PIVE. As variáveis SBP1 e SBP2 apresentaram efeito sobre a produção embrionária e um modelo para estimar a PIVE em touros Senepol com base nestas duas subpopulações foi gerado.

Palavras-chave: bovino, espermatozoide, fertilidade, motilidade, parâmetros cinéticos

1. Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) expandiu-se notavelmente na última década em comparação com a produção *in vivo* de embriões, configurando-se como uma técnica comercial bem estabelecida (Viana, 2018a). O Brasil é responsável por

[1] Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Theriogenology e encontra-se em avaliação para publicação.

produzir 76,2% dos embriões *in vitro* na América do Sul (Viana et al., 2017; Viana, 2018b; Gonçalves e Viana, 2019). A PIVE apresenta destaque na espécie bovina, visto que 92% de todos os embriões bovinos gerados em 2017 em nosso país foram provenientes dessa técnica (Viana, 2018a). A raça Senepol apresenta grande importância nos programas de PIVE, sendo uma raça composta que reúne as características de precocidade e qualidade de carne do *Bos taurus* com a rusticidade do *Bos indicus* (Andrade et al., 2012). O Brasil configura-se como um celeiro da genética mundial da raça, com 785 criadores vinculados à Associação Brasileira dos Criadores de Bovinos Senepol (ABCB Senepol, 2019). Em 2017 a raça Senepol ficou entre as dez raças com maior venda de sêmen, considerando todas as raças de corte com comercialização de sêmen no Brasil (ASBIA, 2017). Entretanto, apesar do crescimento e importância da raça em nosso país, há poucos estudos sobre os aspectos reprodutivos de touros Senepol.

Sabe-se que a capacidade preditiva da análise da qualidade do sêmen na fertilidade potencial de touros e ejaculados precisa ser melhorada (Kastelic e Thundathil, 2008). Os critérios para avaliação seminal incidem sobre o fato de que a população espermática é heterogênea entre indivíduos e entre ejaculados do mesmo indivíduo (Holt e Van Look, 2004; Kanno et al., 2017). A existência de diferentes subpopulações de espermatozoides que apresentam padrões cinéticos particulares é muito conhecida e já foi estudada em diferentes espécies; porém, na análise clássica do sêmen a avaliação das subpopulações é negligenciada, o que pode interferir na correta avaliação de um ejaculado (Martínez-Pastor et al., 2011; Quintero-Moreno et al., 2003).

Avaliar as subpopulações espermáticas pode ser de grande importância para estimar a capacidade de fertilização de amostras de sêmen de bovinos, como também abre novas perspectivas para avaliação de protocolos de criopreservação (Muiño et al., 2008b; Ferraz et al., 2014). Além disso, já foi sugerido que a presença das subpopulações pode estar associada a fatores genéticos específicos, evidenciando a importância em analisar a composição do sêmen quanto às subpopulações espermáticas para prever a capacidade de fertilização do sêmen de um touro e, a partir disso, selecionar animais para reprodução (Abaigar et al., 2001). Essa análise também pode ter repercussões econômicas, uma vez que melhor

análise do sêmen poderia levar à comercialização de doses com maior garantia de qualidade e com maior valor agregado.

Até o presente momento, não foi encontrado nenhum estudo que avaliou as subpopulações espermáticas em touros Senepol e há pouquíssima informação quanto à relação das subpopulações espermáticas e a capacidade fertilizante em touros (Ferraz et al., 2014). O presente trabalho foi realizado para identificar e caracterizar as subpopulações espermáticas no sêmen de touros Senepol e buscar um modelo que considere as subpopulações e outras análises de qualidade espermática para estimar a PIVE.

2. Material e métodos

Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da FCAV/UNESP, Jaboticabal, em 18 de agosto de 2016 (Protocolo Nº 12.807/16).

2.1 Coleta dos dados de produção embrionária

Dados retrospectivos de 386 rotinas de PIVE, que geraram 3.090 embriões da raça Senepol, foram obtidos a partir dos registros pertencentes à empresa Senepol 3G, localizada em Barretos/SP. Todas as rotinas foram produzidas em um mesmo laboratório comercial (In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, Brasil), entre os anos de 2013 e 2017.

2.2 Seleção e acondicionamento das amostras

As amostras de sêmen foram escolhidas com base na presença de dados completos (identificação da doadora e do touro, partida, identificação da amostra seminal, número de oócitos totais (viáveis e inviáveis) e de embriões), em pelo menos duas rotinas de PIVE. Após avaliar a disponibilidade das doses pela empresa Senepol 3G, foram selecionadas 38 amostras de sêmen criopreservado de 28 touros Senepol (20 amostras pertenciam a 20 touros diferentes, 14 amostras pertenciam a

7 touros diferentes e 4 amostras pertenciam a um mesmo touro), sendo que cada amostra é uma partida específica de um touro utilizada nas rotinas de PIVE. As palhetas foram separadas e acondicionadas em botijão criogênico com nitrogênio líquido (-196°C), até o momento das análises.

2.3 Descongelação do sêmen

Conforme padrão do laboratório comercial da empresa In Vitro Brasil, que realizou a produção dos embriões, todas as palhetas avaliadas no experimento foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 45 segundos. Após a descongelação, todas as amostras foram depositadas em tubos cônicos de 1,5mL, homogeneizadas e colocadas em banho-maria seco a temperatura constante de 37°C.

2.4 Lavagem do sêmen

Após a descongelação, todas as amostras passaram por um processo de lavagem para sêmen de touros Senepol, que é realizado pelo laboratório comercial da empresa In Vitro Brasil, antes da fertilização *in vitro* (FIV). Antes de iniciar a lavagem, a concentração foi ajustada em todas as amostras para 25 x 10^6 espermatozoides/mL com o meio que é utilizado para lavagem do sêmen. Para determinar a concentração espermática, uma alíquota de sêmen foi diluída 1:100 em solução formol salina tamponada e as contagens de células foram realizadas em câmara de Neubauer sob microscopia de campo claro (ampliação, 400x). A lavagem foi realizado conforme padrões do laboratório comercial da In Vitro Brasil em todas as amostras de sêmen e consiste basicamente em duas lavagens em baixa força de centrifugação. Detalhes do processo de lavagem não foram divulgados por questões comerciais.

2.5 Análises no sêmen

Logo após a descongelação, uma alíquota de sêmen foi separada para análise da morfologia espermática. Pós-lavagem, todas as amostras passaram por: análise da cinética espermática geral da amostra, análise da cinética individual dos espermatozoides e análises da integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, status oxidativo e resistência da cromatina, por citometria de fluxo. A metodologia de cada análise está descrita nos itens abaixo.

2.5.1 Análise da morfologia espermática

Para análise da morfologia espermática, uma alíquota do sêmen pós-descongelação foi retirada e fixada em 0,5mL de solução formol-salina tamponada, previamente aquecida a 37°C que, posteriormente, foi refrigerada até o momento das análises. Para visualização da morfologia espermática foi utilizada a técnica de preparação úmida sob imersão, com contagem de 200 células, em aumento de 1000x, sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (Nikon®, Eclipse Ni-u, Japão). Após a contagem da porcentagem de defeitos totais (DT), foi realizada também a relação dos defeitos maiores (DMA) e defeitos menores (DME), em porcentagem, conforme é preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

2.5.2 Análise da cinética espermática geral da amostra

Os parâmetros da cinética espermática geral da amostra pós-lavagem foram determinados utilizando análise computadorizada da cinética espermática (CASA; Hamilton Thorne, Ivos 12.3, Beverly, MA, Estados Unidos), com o setup pré-ajustado para análise do sêmen bovino conforme Bicudo (2018). Para efetuar a análise, uma alíquota de 5µL da amostra foi colocada entre lâmina (Kasvi®, Olen K5-7101, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e lamínula de 24 x 24mm (Kasvi®, Olen K5-2424, São José dos Pinhais, PR, Brasil), previamente aquecidas a 37°C. Cinco campos microscópicos aleatórios, selecionados automaticamente, foram analisados em cada amostra. As seguintes variáveis foram consideradas, conforme Goovaerts et al.

(2006): motilidade total (MOT, %), motilidade progressiva (PROG, %), velocidade média da trajetória (VAP, µm/s), velocidade linear progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvillinear (VCL, µm/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH, µm), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %). Além disso, os espermatozoides também foram classificados em quatro categorias com base em sua velocidade: rápida (RAP, VAP > 50µm/s; %), média (MED, 30µm/s < VAP < 50µm/s; %), lenta (SLOW, VAP < 30µm/s ou VSL < 15µm/s; %) e estático (STATIC; espermatozoides sem movimento, %).

2.5.3 Análise da cinética individual dos espermatozoides

Para identificar as subpopulações espermáticas nas amostras foi realizada a análise da cinética individual dos espermatozoides, conforme metodologia previamente descrita por Ferraz et al. (2014). Os padrões de cinética espermática foram determinados utilizando análise computadorizada da cinética espermática (CASA; Hamilton Thorne, Ivos 12.3, Beverly, MA, Estados Unidos), com o mesmo setup previamente ajustado para bovinos na avaliação geral da cinética espermática.

As amostras foram analisadas dentro de um a dois minutos após passar pelo processo de lavagem. Uma alíquota de 5µL da amostra foi colocada entre lâmina (Kasvi®, Olen K5-7101, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e lamínula de 24 x 24mm (Kasvi®, Olen K5-2424, São José dos Pinhais, PR, Brasil), que foram previamente aquecidas a 37°C. Três campos microscópicos aleatórios, selecionados manualmente, foram analisados em cada amostra, utilizando microscópio de contraste de fase com aumento de 200x, seguindo as orientações sobre a aplicação da tecnologia CASA na análise dos espermatozoides (ESHRE, 1998). A motilidade total foi definida como a porcentagem de espermatozoides com velocidade média da trajetória (VAP) superior a 10µm/s. Os parâmetros cinéticos registrados para cada espermatozoide foram: velocidade curvilinear (VCL, µm/s), velocidade linear progressiva (VSL, µm/s), velocidade média da trajetória (VAP, µm/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH, µm), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %)

e coeficiente de oscilação (WOB, %), que foi calculado manualmente conforme equação relatada por Mortimer (2000): (VAP/VCL) * 100.

2.5.4 Análises no citômetro de fluxo

Todas as amostras passaram por cinco análises no citômetro de fluxo pós-lavagem: análises da integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, status oxidativo e resistência da cromatina. Todas as análises foram realizadas no citômetro de fluxo GuavaEasyCyte™ System (Guava® Technologies, Hayward, CA, Estados Unidos) equipado com laser de excitação de argônio 20mW 488nm. As sondas foram adquiridas da Sigma (St. Louis, MO, Estados Unidos) e Molecular Probes (Eugene, OR, Estados Unidos). Antes de realizar as análises de integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e status oxidativo, foram adicionados 300uL de solução salina tamponada (*Phosphate buffered saline*, PBS) sem cálcio e magnésio para aumentar o volume da amostra, diluir e reduzir a chance de passagem de mais de um evento simultaneamente pelo laser. Foram adquiridos 20.000 eventos por amostra em cada análise realizada. Os eventos de interesse, referentes aos espermatozoides, foram selecionados por meio de *gate* retangular em gráfico tipo dotplot da fluorescência amarela *versus forward scatter* nas análises das membranas, status oxidativo e resistência da cromatina. Para o potencial de membrana mitocondrial os espermatozoides foram selecionados por meio de *gate* retangular em gráfico tipo dotplot da fluorescência verde *versus forward scatter*. Na análise do status oxidativo uma segunda seleção foi realizada por meio de *gate* retangular em gráfico tipo dotplot da fluorescência vermelha *versus forward scatter*. Essa seleção é realizada para remover eventos referentes a debris, partículas de sondas e eventos múltiplos. Após a seleção dos eventos de interesse, os dados obtidos foram analisados por meio de gráfico dotplot, quando mais de um parâmetro foi investigado simultaneamente, ou histograma quando foi apenas um parâmetro. As análises foram realizadas utilizando o software FlowJo (versão 10.2 Flow Cytometry Analysis Software - Tree Star INc., Ashland, OR, Estados Unidos).

A integridade das membranas plasmática e acrossomal foi avaliada simultaneamente na mesma amostra, segundo protocolo previamente descrito por Siqueira et al. (2018). As 187.500 células (7,5µL de sêmen a 25 x 10^6 espermatozoides/mL) foram incubadas por cinco minutos, a 37ºC, com 10µM de iodeto de propídio (IP) associado a 5µg de *Pisum sativum* conjugado com fluoresceína (FITC-PSA). Quatro categorias de espermatozoides foram identificadas nessa análise: PIAI (espermatozoide com membranas plasmática e acrossomal íntegras), PIAL (espermatozoide com membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada), PLAI (espermatozoide com membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra) e PLAL (espermatozoide com membranas plasmática e acrossomal lesionadas).

Para avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi seguido protocolo previamente descrito por Siqueira et al. (2018). As 187.500 células (7,5µL de sêmen a 25 x 10^6 espermatozoides/mL) foram incubadas por cinco minutos, a 37ºC, com 1µM de iodeto de tetraetilbenzimidazol-carbocianina (JC-1). Duas categorias de espermatozoides foram identificadas nessa análise: APM (espermatozoide com alto potencial mitocondrial) e BPM (espermatozoide com baixo potencial mitocondrial).

Para análise do status oxidativo, foi seguido protocolo previamente descrito por Castro et al. (2016). As 187.500 células (7,5µL de sêmen a 25 x 10^6 espermatozoides/mL) foram coradas com CellROX™ green (concentração final de 5µM) por 30 minutos a 37°C e, nos últimos 10 minutos, IP foi adicionado a uma concentração final de 6µM. Quatro categorias de espermatozoides foram identificadas com essa análise: IP-VD+ (espermatozoide com membrana plasmática íntegra e com estresse oxidativo), IP-VD- (espermatozoide com membrana plasmática íntegra e sem estresse oxidativo), IP+VD+ (espermatozoide com membrana plasmática lesionada e com estresse oxidativo) e IP+VD- (espermatozoide com membrana plasmática lesionada e sem estresse oxidativo).

A análise de resistência da cromatina foi realizada com base no ensaio de estrutura da cromatina dos espermatozoides (*Sperm Chromatin Structure Assay*, SCSA), conforme protocolo descrito por Siqueira et al. (2018). As 375.000 células (15µL de sêmen a 25 x 10^6 espermatozoides/mL) foram primeiramente adicionadas a 100uL de tampão TNE (10mM Tris-HCl; 0,15M NaCl; 1mM EDTA dissódico; pH =

7,4), centrifugadas em spin, tiveram o sobrenadante descartado e o pellet suspendido em 50µL de tampão TNE. Em seguida as amostras foram acrescidas de 100µL de solução detergente ácida (0,08M HCl; 0,15M NaCl; 0,1% (v/v) Triton X-100; pH = 1,4). Após 30 segundos, 300µL de solução de laranja de acridina (6µg/mL em 0,1M de ácido cítrico; 0,2M Na_2HPO_4; 1mM EDTA; 0,15M NaCl; pH = 6,0) foram adicionados e a avaliação foi realizada após três a cinco minutos. Duas categorias de espermatozoides foram identificadas nessa análise: LA+ (espermatozoide com baixa resistência da cromatina) e LA- (espermatozoide com alta resistência da cromatina). O percentual de células com alteração de cromatina foi determinado em histograma do parâmetro derivado αTY log. Este parâmetro derivado é o resultado da fluorescência amarela dividida pela fluorescência total (somatória da fluorescência amarela e verde).

Como controle da avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial mitocondrial, uma amostra com alta porcentagem de integridade das membranas plasmática e acrossomal e alto potencial mitocondrial foi dividida em duas partes. Uma parte foi preparada como descrito acima (controle negativo). A outra parte foi utilizada como controle de membranas plasmática e acrossomal lesionadas e baixo potencial mitocondrial (controle positivo), a qual foi submetida a cinco ciclos de congelação e descongelação (1' em nitrogênio líquido seguido de 1' em banho-maria a 60ºC). Para controle da análise de resistência da cromatina, parte da amostra foi preparada como descrito acima (controle negativo) e como controle da cromatina danificada (controle positivo) a parte restante foi incubada com detergente ácido modificado (1,2M HCl; 0,15M NaCl; 0,1% (v/v) Triton X-100; pH = 0,1) por um minuto. O controle positivo de cada análise foi misturado ao seu respectivo controle negativo nas seguintes proporções 1:3 ou 25% positivo, 1:1 ou 50% positivo e 3:1 ou 75% positivo. A seleção dos eventos referentes aos espermatozoides e os limiares negativos e positivos foram estabelecidos para cada análise para atingir o maior coeficiente de determinação na análise dos controles e respectivas proporções. Todas as análises alcançaram coeficientes maiores que 0,97. A seleção e limiares foram determinados na validação e foram aplicados para todas as amostras experimentais sem modificações. Todos os protocolos de controle mencionados seguiram metodologia descrita por Siqueira et al. (2018).

2.6 Análises estatísticas

A descrição individual de cada variável investigada contém médias, erro padrão da média, valores máximos e valores mínimos. Foram realizadas análises estatísticas multivariadas para caracterização das subpopulações espermáticas e para estabelecer a relação das variáveis com a PIVE, conforme descrição abaixo.

A estrutura de grupos contida na distribuição dos espermatozoides foi investigada por análise exploratória multivariada de agrupamento por método hierárquico, enquanto que a estrutura de dependência contida nas variáveis utilizadas foi explorada por análise de componentes principais (ACP). A análise de agrupamento por método hierárquico foi processada com a distância euclidiana como medida de semelhança e o algoritmo de Ward como método de ligação de grupos cuja estrutura é observada em um dendrograma (Holt e Van Look, 2004).

A análise de agrupamento não hierárquica processada com o algoritmo k-médias obteve uma classificação dos espermatozoides de acordo com seus padrões. Esta análise permitiu compreender melhor as estruturas dos grupos. Ambos os métodos foram processados de modo que cada espermatozoide pertenceu a um e somente um grupo e as análises foram executadas após a padronização (média nula e variância unitária) das oito variáveis quantitativas contínuas obtidas pelo sistema CASA (VCL, VSL, VAP, ALH, BCF, LIN, STR e WOB). As diferenças entre as médias das variáveis entre os grupos foram analisadas pelo teste de Tukey com o PROC GLM (SAS Inst. Inc., Cary, CN, Estados Unidos), e consideradas significativas quando $p<0,05$.

Para estudar a relação das subpopulações espermáticas e das demais variáveis de qualidade do sêmen com a PIVE, a variável-resposta produção de embriões foi categorizada com base na análise do conjunto de dados do trabalho juntamente com relatos da PIVE em animais Senepol (Heinzen et al., 2014; Farias et al., 2016; Watanabe et al., 2017). A categorização foi a seguinte: alta produção embrionária (taxas entre 30 e 60%), média produção embrionária (taxas entre 20 e 29,99%) e baixa produção embrionária (taxas entre 0 e 19,99%). Com essa categorização, 11 amostras ficaram na categoria alta produção embrionária, 14 na

média e 13 na baixa. A diferença entre as três categorias foi confirmada pelo procedimento GLM (P<0,05).

A análise de regressão logística para a variável classe de taxa de produção de embriões foi realizada pelo PROC GENMOD (SAS Inst. Inc., Cary, CN, Estados Unidos), que é um procedimento do programa SAS que usa o método de Modelos Lineares Generalizados (McCullagh e Nelder, 1989). Com o intuito de reduzir o número de variáveis obtidas com todas as avaliações de qualidade do sêmen, sem perder a resposta das análises realizadas, algumas variáveis foram selecionadas e utilizadas na tentativa de criar um modelo preditivo: todas as subpopulações espermáticas identificadas foram utilizadas em conjunto com as variáveis PIAI, APM, IP-VD- e LA-, que representam uma categoria de espermatozoides em cada avaliação realizada no citômetro de fluxo e DT que representa o resultado total de defeitos avaliados na morfologia espermática. Após avaliar o efeito dessas variáveis sobre a PIVE, o modelo preditivo utilizado foi de regressão logística que incluiu os efeitos de duas subpopulações espermáticas como covariáveis. A escolha do modelo foi feita com base nos critérios de discrepância de *deviance* e de X^2 (qui-quadrado) generalizada de Pearson.

3. Resultados

A taxa média de produção embrionária para as 38 amostras foi de 24,95 ± 1,61 (média ± erro padrão da média; %); valor estabelecido após análise de 386 rotinas de PIVE e calculado com base no número de oócitos totais. A taxa mínima apresentada entre as amostras foi de 5,91% e a máxima foi de 58,42%.

A descrição individual de cada variável investigada na avaliação da cinética espermática geral das amostras pelo sistema CASA pós-lavagem está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 Padrão cinético de 38 partidas de sêmen de touros Senepol pós-lavagem para fertilização *in vitro*.

Variáveis analisadas	Valor mínimo	Média ± EPM	Valor máximo
MOT (%)	8	32,2 ± 3,1	83
PROG (%)	3	23,5 ± 2,4	62
RAP (%)	6	29,5 ± 3,0	82
MED (%)	0	2,7 ± 0,4	10
SLOW (%)	0	6,9 ± 0,7	16
STATIC (%)	12	60,8 ± 3,3	89
VAP (µm/s)	98	123,4 ± 2,7	141
VSL (µm/s)	73	86,2 ± 1,3	94
VCL (µm/s)	194	211 ± 4,0	228
ALH (µm)	5	5,5 ± 0,1	6
BCF (Hz)	31	34,8 ± 0,5	38
STR (%)	55	81,4 ± 1,2	92
LIN (%)	26	52,6 ± 1,7	72

Abreviações: MOT: motilidade total; PROG: motilidade progressiva; RAP: VAP > 50µm/s; MED: 30µm/s < VAP < 50µm/s; SLOW: VAP < 30µm/s ou VSL < 15µm/s; STATIC: espermatozoides sem movimento; VAP: velocidade média da trajetória; VSL: velocidade linear progressiva; VCL: velocidade curvillinear; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide; BCF: frequência de batimento flagelar cruzado; STR: retilinearidade; LIN: linearidade; EPM: erro padrão da média.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da análise da morfologia espermática e das cinco análises realizadas no citômetro de fluxo pós-lavagem em todas as amostras.

Tabela 2 Morfologia espermática avaliada pós-descongelação, e integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, status oxidativo e resistência da cromatina, avaliadas em 38 amostras de sêmen de touros Senepol, pós-lavagem para fertilização *in vitro*.

Variáveis analisadas	Valor mínimo	Média ± EPM	Valor máximo
DT (%)	7,0	15,9 ± 1,0	36,5
DMA (%)	0,5	9,4 ± 1,1	35,0
DME (%)	1,5	6,5 ± 0,4	11,5
PIAI (%)	9,9	35,2 ± 2,9	76,0
PIAL (%)	0,8	3,2 ± 0,3	8,7
PLAI (%)	3,9	14,9 ± 1,6	49,1
PLAL (%)	12,4	46,7 ± 3,5	83,4
APM (%)	0,6	41,4 ± 3,9	90,5
BPM (%)	9,5	58,6 ± 3,9	99,4
IP-VD+ (%)	0,1	8,5 ± 1,6	38,3
IP-VD- (%)	8,3	26,6 ± 2,2	58,8
IP+ VD+ (%)	0,04	11,6 ± 3,1	66,2
IP+VD- (%)	0,9	53,3 ± 4,0	88,3
LA+ (%)	0,02	0,1 ± 0,01	0,3
LA- (%)	99,7	99,9 ± 0,01	100,0

Abreviações: DT: defeitos totais; DMA: defeitos maiores; DME: defeitos menores; PIAI: membranas plasmática e acrossomal íntegras; PIAL: membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada; PLAI: membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra; PLAL: membranas plasmática e acrossomal lesionadas; APM: alto potencial mitocondrial; BPM: baixo potencial mitocondrial; IP-VD+: membrana plasmática íntegra e com estresse oxidativo; IP-VD-: membrana plasmática íntegra e sem estresse oxidativo; IP+VD+: membrana plasmática lesionada e com estresse oxidativo; IP+VD-: membrana plasmática lesionada e sem estresse oxidativo; LA+: baixa resistência da cromatina; LA-: alta resistência da cromatina; EPM: erro padrão da média.

A ACP permitiu a projeção dos espermatozoides em um espaço bidimensional formado por dois componentes principais (CP1 x CP2). Esta projeção bidimensional preservou 78,2% da variância contida no conjunto de dados original (Figura 1).

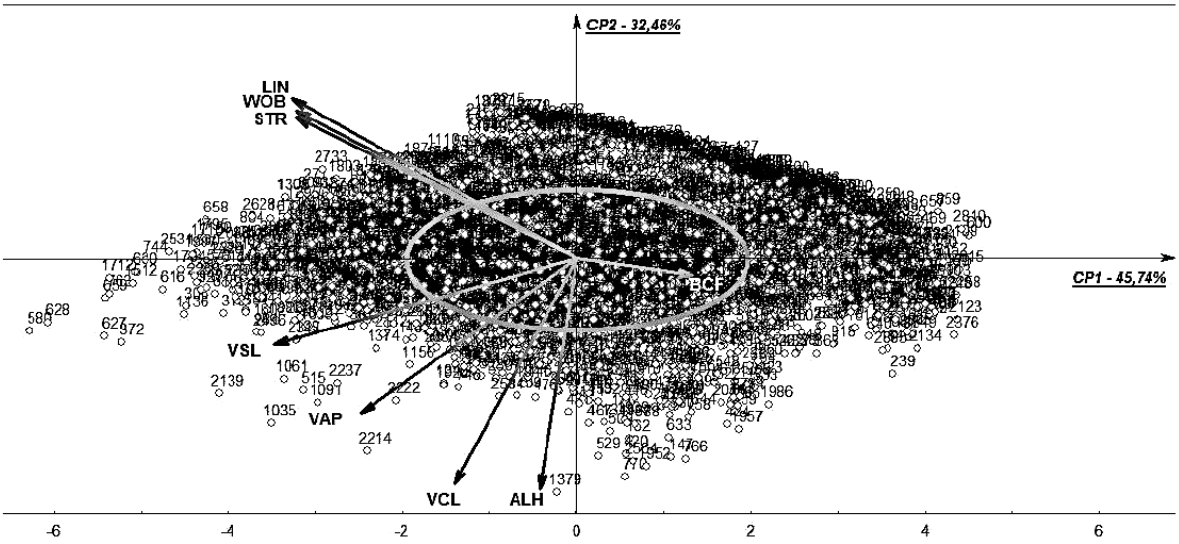

Figura 1. Gráfico Biplot (CP1 x CP2) da distribuição dos 3114 espermatozoides e parâmetros cinéticos avaliados no sêmen de touros Senepol pós-lavagem para fertilização *in vitro*. Direções dos vetores determinam altas pontuações nos respectivos parâmetros.

Abreviações: VAP: velocidade média da trajetória; VSL: velocidade linear progressiva; VCL: velocidade curvilinear; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide; BCF: frequência de batimento flagelar cruzado; STR: retilinearidade; LIN: linearidade; WOB: coeficiente de oscilação.

Na Tabela 3 são apresentadas as cargas dos componentes principais que são correlações entre cada variável original e um componente principal. Quanto maior o valor do módulo dessas cargas, maior o poder discriminatório de uma variável. Assim, no CP1 as variáveis mais relevantes foram VAP, VSL, STR, LIN e WOB e todas agem de forma direta, pois possuem mesmo sinal, ou seja, quando o valor de uma aumenta o valor da outra também aumenta. Em CP2 as variáveis mais relevantes foram VCL e ALH também agindo de forma direta. A variável BCF não apresenta poder discriminatório nesta projeção.

Tabela 3 Cargas dos componentes principais 1 e 2 (CP1 e CP2) avaliada nos dados, obtidos pelo sistema CASA, do sêmen de touros Senepol, pós-lavagem para fertilização *in vitro*.

	CP1	CP2
VAP	**-0,8046**	-0,5390
VSL	**-0,9285**	-0,2595
VCL	-0,4214	**-0,8856**
ALH	-0,0414	**-0,9204**
BCF	0,2132	-0,0268
STR	**-0,7494**	0,4103
LIN	**-0,8552**	0,4935
WOB	**-0,7948**	0,4412
Autovalor	3,659	2,597
% Variância total	45,74	32,46

Abreviações: VAP: velocidade média da trajetória; VSL: velocidade linear progressiva; VCL: velocidade curvillinear; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide; BCF: frequência de batimento flagelar cruzado; STR: retilinearidade; LIN: linearidade; WOB: coeficiente de oscilação.

O dendrograma resultante da análise de agrupamento por método hierárquico obtido com os dados individuais dos espermatozoides pós-lavagem está ilustrado na Figura 2 e permitiu a identificação de três grupos de espermatozoides.

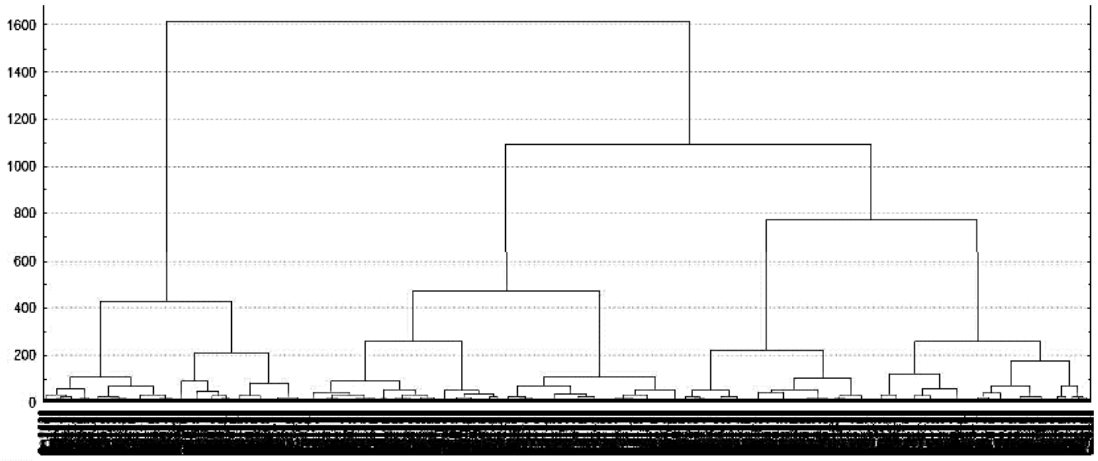

Figura 2. Dendrograma derivado da análise de agrupamento hierárquico dos 3114 espermatozoides avaliados no sêmen de touros Senepol pós-lavagem para fertilização *in vitro*.

O padrão cinético dos três grupos é distinto em relação às variáveis analisadas e está apresentado na Figura 3.

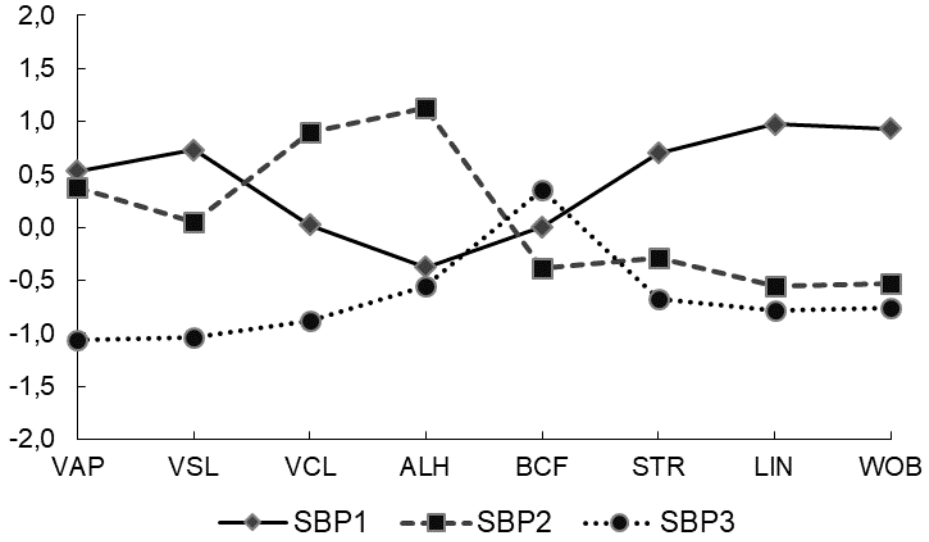

Figura 3. Padrão cinético com a divisão em três subpopulações de espermatozoides (SBP1, SBP2 e SBP3) na avaliação do sêmen de touros Senepol pós-lavagem para fertilização *in vitro*.

Abreviações: VAP: velocidade média da trajetória; VSL: velocidade linear progressiva; VCL: velocidade curvillinear; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide; BCF: frequência de batimento flagelar cruzado; STR: retilinearidade; LIN: linearidade; WOB: coeficiente de oscilação.

Dos 3114 espermatozoides analisados: 41% foram agrupados na subpopulação 1 (SBP1); 28,6% foram agrupados na subpopulação 2 (SBP2) e 30,4% foram agrupados na subpopulação 3 (SBP3). A SBP1 é caracterizada por movimento rápido e progressivo por possuir maiores valores de VAP, VSL, STR, LIN e WOB. A SBP2 é caracterizada por movimento rápido e não progressivo, o que pode configurar um movimento de hiperativação por apresentar os maiores valores de VCL e ALH em conjunto com valores moderados de LIN, STR e WOB. A SBP3 é caracterizada por movimento lento e não progressivo por apresentar menores valores de VAP, VSL, VCL, STR, LIN e WOB (Tabela 4).

Tabela 4 Média (± EPM) dos parâmetros de cinética das três subpopulações espermáticas, identificadas em 38 amostras de sêmen criopreservado de touros Senepol após passar por processo de lavagem para fertilização *in vitro*.

Parâmetros de cinética	Subpopulações		
	SBP1	SBP2	SBP3
Número de espermatozoides (%)	1277 (41)	890 (28,6)	947 (30,4)
VAP (µm/s)	129,8 ± 1,4[a]	121,4 ± 1,2[b]	40,3 ± 0,7[c]
VSL (µm/s)	122,4 ± 1,4[a]	84,4 ± 1,1[b]	23,8 ± 0,6[c]
VCL (µm/s)	175,2 ± 1,9[b]	252,5 ± 2,3[a]	96,1 ± 1,7[c]
ALH (µm)	5,6 ± 0,1[b]	11,7 ± 0,1[a]	4,8 ± 0,1[c]
BCF (Hz)	36,1 ± 0,3[b]	30,5 ± 0,4[c]	41,1 ± 0,5[a]
STR (%)	94,3 ± 0,2[a]	70,6 ± 0,7[b]	61,6 ± 0,9[c]
LIN (%)	71,6 ± 0,4[a]	34,5 ± 0,4[b]	29,0 ± 0,6[c]
WOB (%)	75,7 ± 0,3[a]	48,7 ± 0,3[b]	44,5 ± 0,4[c]

Abreviações: VAP: velocidade média da trajetória; VSL: velocidade linear progressiva; VCL: velocidade curvillinear; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide; BCF: frequência de batimento flagelar cruzado; STR: retilinearidade; LIN: linearidade; WOB: coeficiente de oscilação; EPM: erro padrão da média.

Com a análise de regressão logística foi possível observar quais variáveis (SBP1, SBP2, SBP3, PIAI, APM, IP-VD-, LA- e DT) tem efeito sobre as categorias da taxa de produção embrionária. Somente as variáveis SBP1 e SBP2 apresentaram efeito sobre a produção embrionária (p = 0,0156 e p = 0,0359; respectivamente). Um modelo com essas variáveis foi gerado para estimar a produção embrionária de forma categorizada (alta, média ou baixa):

Produção embrionária = 0,1563 + 0,0328(SBP1) + 0,0173(SBP2)

Ao avaliar uma amostra de sêmen, respeitando as mesmas condições do presente estudo, é possível substituir os valores de SBP1 e SBP2 na equação acima pelo valor absoluto da porcentagem de espermatozoides pertencentes a estas subpopulações, o que resultará em um valor final. No modelo gerado, se esse valor for mais próximo de 1, a categoria do animal é baixa produção embrionária, se o valor for mais próximo de 2, a categoria é média produção embrionária e se o valor resultante for mais próximo do número 3, significa que aquele animal provavelmente terá uma alta taxa de produção embrionária.

4. Discussão

A multiplicidade de atributos necessários para o espermatozoide fertilizar e gerar um embrião, aliado à heterogeneidade da suspensão espermática são fatores que obscurecem a predição da fertilidade de um animal (Rodríguez-Martínez, 2013). Alguns estudos já mostraram existir relação entre as subpopulações espermáticas, definidas com base na cinética dos espermatozoides e fertilidade (Quintero-Moreno et al., 2003; Yániz et al., 2015; Ferraz et al., 2014). Pioneiramente, com o presente trabalho, foi possível identificar o número de subpopulações espermáticas presentes no sêmen de touros Senepol após lavagem para FIV, assim como caracterizá-las e verificar qual apresenta efeito sobre a PIVE. Também foi possível gerar um modelo para estimar a PIVE com o uso das subpopulações espermáticas.

Existem poucos trabalhos com resultados de PIVE em animais Senepol. Farias et al. (2016) observaram as seguintes taxas de produção embrionária utilizando dois reprodutores Senepol diferentes: 29,10% e 34,21%. Watanabe et al. (2017) quando estudaram a produção embrionária em bovinos encontraram a seguinte variação em animais Senepol quando a taxa de produção embrionária foi dividida em quartis: 26 a 33%, além de observar que há diferença entre raças quanto aos resultados da PIVE. Heinzen et al. (2014) relataram taxa de 30,65% na raça Senepol, além de também observarem que o resultado da PIVE é influenciado pela raça, visto que animais Girolando e Angus apresentaram taxas diferentes (19,69% e 16,5%, respectivamente). Os mesmos autores relataram que a raça Senepol foi a segunda raça que apresentou maior amplitude nos resultados de produção embrionária. A taxa média apresentada em nosso trabalho (24,95%) é um pouco inferior aos resultados relatados, possivelmente pelo fato dos nossos dados também apresentarem grande amplitude nos resultados (taxa mínima de 5,91% e máxima de 58,42%). Além disso, a comparação da PIVE entre trabalhos é difícil, pelo fato de diversos fatores interferirem nos seus resultados, como: oócito, meios e protocolos utilizados, microambiente de manipulação, sêmen, entre outros (Palma e Sinowatz, 2004; Akyol et al., 2014; Chrenek et al., 2014; Mello et al., 2016).

A avaliação da cinética espermática já mostrou ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides em bovinos (Farrel et al., 1998; Januskauskas et al., 2000; Kathiravan et al. 2008; 2011; Sellem et al., 2015). Entretanto, quando o estudo da fertilidade em relação às características

espermáticas tem como base a média dos valores e considera o ejaculado como uma amostra homogênea, perde-se na capacidade de predição. A caracterização da heterogeneidade dos espermatozoides individualmente com base na cinética, está ganhando interesse no setor pecuário com o intuito de determinar melhor a fertilidade dos machos (Ramón et al., 2013; Yániz et al., 2015). A identificação das subpopulações espermáticas, definidas com base na cinética individual dos espermatozoides, já foi estudada em diferentes espécies animais, como: gazelas, (Abaigar et al., 1999; 2001), veados (Martinez-Pastor et al., 2005), carneiros (Bergstein-Galan et al., 2017; Bravo et al., 2011; Ledesma et al., 2017), bodes (Vázquez et al., 2015), javalis (Estrada et al., 2017; Flores et al., 2008; 2009), búfalos (Maylem et al., 2017), jumentos (Flores et al., 2008), garanhões (Quintero-Moreno et al., 2003), coelhos (Quintero-Moreno et al., 2007), cães (Dorado et al., 2011; Peña et al., 2012) e gatos (Souza et al., 2018).

Em bovinos, diferentes trabalhos identificaram quatro subpopulações de espermatozoides (Muiño et al., 2008a; 2008b; 2009; Ferraz et al., 2014): uma subpopulação composta por espermatozoides mais rápidos e progressivos; outra caracterizada por espermatozoides mais lentos, porém progressivos; uma que contém células com padrão de hiperativação e outra subpopulação constituída por espermatozoides não progressivos e com fraca motilidade. Em nosso trabalho, somente três subpopulações foram identificadas: a SBP1 que apresenta movimento rápido e progressivo, a SBP2 que é caracterizada por movimento hiperativado e a SBP3 que apresenta movimento lento e não progressivo. A subpopulação caracterizada por movimento lento e progressivo não foi identificada em nosso trabalho, possivelmente pelo fato da avaliação ter sido realizada em condições diferentes dos estudos relatados, que aplicaram as avaliações no sêmen fresco ou após a descongelação. Além disso, de acordo com estudo recente de Ibanescu et al. (2020) o momento em que a análise das subpopulações de espermatozoides é realizada (antes da congelação, pós-descongelação ou pós-incubação) influencia na sua relação com a fertilidade.

Já foi proposto que a distribuição dos espermatozoides em cada subpopulação seja dinâmica, ou seja, ela muda de acordo com a condição a que o espermatozoide é submetido (Abaigar et al., 2001; Muiño et al., 2008a). O presente

trabalho avaliou as subpopulações espermáticas após lavagem do sêmen para a FIV. A preparação dos espermatozoides para FIV geralmente envolve algum procedimento para separar os espermatozoides do plasma seminal, do extensor e/ou crioprotetores (Parrish, 2014). A lavagem do sêmen pode ter feito com que espermatozoides com movimento lento e progressivo, tenham mudado seu padrão cinético de forma a serem deslocados para outras subpopulações. Apesar da força de centrifugação na lavagem não ser alta, sabe-se que mesmo baixa força de centrifugação causa redução da motilidade dos espermatozoides e que a centrifugação por si só causa danos mecânicos às células, sendo que esses danos podem ser subletais (Alvarez et al., 1993; Sharma et al., 1997). Espermatozoides que sofreram esse tipo de lesão possivelmente perderam sua progressividade e passaram para a subpopulação caracterizada por movimento lento e não progressivo. Outra possibilidade é que alguns espermatozoides com característica de movimento lento, mas progressivo sofreram perda da integridade estrutural e da capacidade de controle da permeabilidade seletiva da membrana, levando-os ao padrão de hiperativação. García-Herreros e Leal (2014) relataram que uma simples lavagem do sêmen faz com que cerca de 34% dos espermatozoides iniciem a capacitação e cerca de 12% completem a reação acrossomal. Sabe-se que o processo de capacitação pode desenvolver a motilidade hiperativada, por meio da alteração de pH e ativação de canais permeáveis ao Ca^{2+}, e isto pode ter ocorrido em nosso trabalho, o que pode ter levado à alteração das subpopulações espermáticas encontradas (Marquez e Suarez, 2007).

Outro fato que pode ter contribuído para o nosso estudo ter encontrado somente três subpopulações espermáticas, está no fato da raça utilizada em nosso experimento ser diferente das raças avaliadas nos trabalhos já publicados em bovinos. Três trabalhos estudaram as subpopulações espermáticas em touros da raça Holandesa (Muiño et al., 2008a; 2008b; Ferraz et al., 2014) e outro em touros da raça *Asturiana de los Valles* (Muiño et al., 2009). Em trabalho de Kanno et al. (2017) foi também relatado a presença de quatro subpopulações espermáticas no sêmen de touros *Japanese black*, porém eles observaram que há variação na frequência das subpopulações entre touros e entre ejaculados do mesmo animal. Possivelmente, deve haver variação entre raças também no que diz respeito às

subpopulações espermáticas, visto que as diferenças entre raças também alteram os resultados da PIVE (Heinzen et al., 2014; Watanabe et al., 2017).

A presença de uma subpopulação rápida e linear tem sido proposta como um bom indicador da qualidade da amostra, enquanto que uma subpopulação predominantemente lenta e não-linear seria um marcador de má qualidade (Martínez-Pastor et al., 2011). Muiño et al. (2008a) afirmaram que possivelmente a subpopulação caracterizada por movimento rápido e progressivo seria a subpopulação mais adequada para realizar a fertilização. Em equinos, já foi relatado que ejaculados com alta fertilidade após inseminação artificial (IA), apresentavam padrão de subpopulação de espermatozoides rápidos e lineares (Quintero-Moreno et al., 2003). Em concordância, Yániz et al. (2015) observaram em carneiros que maiores porcentagens de espermatozoides com movimentos rápidos e lineares é encontrada no grupo que apresenta alta fertilidade após IA. Em bovinos, no estudo de Ferraz et al. (2014) sugere-se que a presença de alta porcentagem de espermatozoides que se movem rápida e progressivamente no ejaculado de um touro é positivamente correlacionada com a fertilidade *in vitro*. Em nosso estudo também foi encontrado que a SBP1, caracterizada por movimento rápido e progressivo é a que apresenta maior efeito sobre a taxa da PIVE. Farrell et al. (1998) relataram em touros, alta correlação ($r^2 = 0,97$) entre os parâmetros VAP, VSL, BCF, STR e LIN obtidos na análise geral da amostra no CASA e a fertilidade *in vivo.* Estes parâmetros coincidem com aqueles que caracterizam a SBP1 (altos valores de VAP, VSL, STR e LIN) e, possivelmente, já refletiam o fato de um maior número de espermatozoides com padrão cinético característico da SBP1 alcançar melhores resultados de fertilidade.

A SBP2, caracterizada por movimento de hiperativação foi a segunda subpopulação que apresentou efeito sobre a PIVE. A motilidade de espermatozoides hiperativados aparece sob diferentes condições físicas e em diferentes espécies, mas basicamente envolve aumento na amplitude dos batimentos flagelares e assimetria no batimento (Suarez e Ho, 2003; Marquez e Suarez; 2004). O movimento de hiperativação é caracterizado por VCL ≥ 100µm/s em conjunto com LIN < 60% e ALH ≥ 5µm, compatível com os valores apresentados pela SBP2 (Mortimer e Mortimer, 1990; Almog et al., 2008). A hiperativação pode ser relevante

para o sucesso da fertilização, porque aumenta a capacidade dos espermatozoides se soltarem da parede do oviduto, se movimentarem no lúmen do oviduto, penetrarem nas substâncias mucosas e, finalmente, penetrarem na zona pelúcida do oócito (Suarez e Ho, 2003). Em nosso estudo, por se tratar de uma associação com a PIVE, a importância da hiperativação está em auxiliar os espermatozoides a penetrarem nas células do *cumulus* e na zona pelúcida do oócito (Yanagimachi, 1984; Marquez e Suarez, 2004).

Alguns estudos corroboram com o fato da SBP2 apresentar efeito sobre os resultados de produção embrionária. Em estudo de Donnelly et al. (1998) foi observado que a porcentagem de espermatozoides hiperativados foi maior em amostras que alcançaram taxas ≥ 50% de fertilização e prenhez. Em concordância, Sukcharoen et al. (1995) relataram que a hiperativação foi o aspecto mais importante do movimento espermático em relação à taxa de fertilização *in vitro*. Em estudo de García-Álvarez et al. (2014), em carneiros, foi relatado que maior porcentagem da subpopulação espermática caracterizada por movimento hiperativado está associada a maior taxa de clivagem na FIV.

Segundo Curry (2000), maior heterogeneidade de espermatozoides dentro do ejaculado garantiria maior potencial de fertilização, visto que os atributos necessários para o sucesso da fertilização são diferentes de acordo com o processo de reprodução (monta natural, IA e FIV). Breznick et al. (2013) relataram que a hiperativação induzida no sêmen que passa por processo de lavagem é um valioso parâmetro espermático em relação aos resultados da FIV, enquanto a hiperativação espontânea não tem a mesma importância, pois nesse caso os espermatozoides não permanecem no estado hiperativado indefinidamente e sim variam entre movimentos hiperativados e não hiperativados. Possivelmente, se as subpopulações espermáticas forem estudadas quanto ao seu efeito sobre outros tipos de estratégias reprodutivas, como monta natural e IA, ou em condições de hiperativação espontânea, é possível que os resultados sejam diferentes. Em touros, foi relatado que a subpopulação de espermatozoides com motilidade rápida e progressiva, avaliada antes da congelação, foi correlacionada positivamente com o resultado da IA (Ibanescu et al., 2020).

Outras análises de qualidade espermática foram adicionadas em nosso estudo com o intuito de melhorar a estimativa da fertilidade. Entretanto, foi observado que as avaliações de integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, status oxidativo, resistência da cromatina e morfologia não apresentaram efeito sobre as categorias de produção embrionária. Pelo fato das amostras utilizadas serem doses comerciais, que já foram extensivamente utilizadas em diferentes sistemas de reprodução e não apresentaram evidentes problemas em relação à fertilidade, possivelmente o efeito dessas variáveis acabou sendo reduzido, além do fato do número de amostras não ser tão expressivo para evidenciar pequenas variações entre elas. Ademais, uma limitação dos testes de qualidade espermática *in vitro* é que diferentes parâmetros são geralmente avaliados separadamente na amostra, perdendo o poder de integração de variáveis. O melhor seria desenvolver métodos de análise de qualidade de sêmen mais integrados, permitindo-nos avaliar diferentes parâmetros simultaneamente, célula por célula (Yániz et al., 2017).

É importante ressaltar que estes resultados mostraram que duas subpopulações espermáticas são as variáveis mais sensíveis para explicar a taxa de produção embrionária, entretanto o modelo que estima a PIVE apresentado precisa ser validado com um número maior de amostras e de touros, em outras populações, para confirmar se de fato essas subpopulações servem para explicar a taxa de produção embrionária em um conjunto de dados diferentes. Mesmo assim, a partir dos resultados obtidos com este trabalho, foi possível observar que o uso abrangente do sistema CASA para identificar as subpopulações espermáticas nos touros Senepol contribui para explicar os resultados obtidos na PIVE. Além disso, o conhecimento obtido com este trabalho pode ser útil para esclarecer problemas de fertilidade de alguns touros, identificar animais que apresentam subfertilidade e selecionar os touros que apresentam melhor qualidade seminal e direcioná-los para o uso em biotecnologias reprodutivas, o que contribui para o progresso genético e econômico do rebanho no país. Mais estudos devem ser realizados para buscar relacionar as subpopulações espermáticas em bovinos com outros meios de reprodução, como IA e monta natural.

5. Conclusões

Foram identificadas três subpopulações no sêmen criopreservado de touros Senepol após passar por processo de lavagem para PIVE. A subpopulação caracterizada por movimento rápido e progressivo tem maior efeito sobre os resultados da taxa de produção embrionária, seguida pela subpopulação que apresenta movimento hiperativado. A análise de regressão logística gerou um modelo com estas subpopulações para estimar a PIVE.

6. Referências

Abaigar T, Cano M, Pickard AR, Holt MV (2001) Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. **Reproduction** 122:265-73.

Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, Del Barrio G (1999) Sperm subpopulations in boar (*Sus Scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. **Biology of Reproduction** 60:32-41.

ABCB Senepol. Associação Brasileira dos Criadores de Bovinos Senepol. **Associados**, 2019a. Disponível em: http://senepol.org.br/associacao/associados/. Acesso em: 06 de agosto de 2019.

Akyol N, Kizil SH, Satilmis M, Karasahin T (2014) Investigation of bull effect on *in vitro* embryo production. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi** 20:561-564.

Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nuñez RC, Heyner S, Caballero PP, Storey BT (1993) Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. **Human Reproduction** 8:1087-1092.

Almog T, Lazar S, Reiss N, Etkovitz, N, Milch E, Rahamim N, Dobkin-Bekman M, Rotem R, Kalina M, Ramon J, Raziel A, Breitbart H, Seger R, Naor Z (2008) Identification of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38MAPK as regulators

of human sperm motility and acrosome reaction and as predictors of poor spermatozoa quality. **The Journal of Biological Chemistry** 283:14479-14489.

Andrade GA, Fernandes MA, Knychala RM, Pereira Junior MV, Oliveira AJ, Nunes, DP, Bonato GL, Santos RM (2012) Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 36:66-69.

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **INDEX ASBIA 2017**, 2017. Disponível em: https://www.asbia.org.br/wp-content/uploads/2018/10/INDEX-ASBIA-2017_completo.pdf. Acesso em: 06 de agosto de 2019.

Bergstein-Galan TG, Weiss RR, Kozicki LE, Bicudo SD (2017) Sperm subpopulations in ejaculated sperm and spermatozoa recovered from ovine epididymides up to 48 h after death. **Animal Reproduction Science** 187:20-27.

Bicudo LC (2018) **Caracterização das subpopulações e atributos espermáticos como método preditivo de desempenho na produção *in vitro* de embriões em bovinos**. 129 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – USP, São Paulo.

Bravo JA, Montanero J, Calero R, Roy TJ (2011) Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. **Animal Reproduction Science** 129:22-29.

Breznik BP, Kovacic B, Vlaisavljevic V (2013) Are sperm DNA fragmentation, hyperactivation, and hyaluronan-binding ability predictive for fertilization and embryo development *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection? **Fertility and Sterility** 99:1233-1241.

Castro LS, Assis PM, Siqueira AFP, Hamilton TRS, Mendes CC, Losano JDA, Nichi M, Visintin JA, Assumpção MEOA (2016) Sperm oxidative stress in detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2016:1-12.

CBRA (2013) **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal.** 3 ed. Belo Horizonte: CBRA; 2013.104 p.

Chrenek P, Kubovicova E, Olexícová L, Makarevich AV, Toporcerová S, Ostró A (2014) Effect of body condition and season on yield and quality of *in vitro* produced bovine embryos. **Zygote** 23:893-899.

Curry MR (2000) Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction** 5:46-52.

Donnelly ET, Lewis SEM, McNally JA, Thompson W (1998) *In vitro* fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. **Fertility and Sterility** 70:305-314.

Dorado J, Alcaráz L, Duarte N, Portero JM, Acha D, Hidalgo M (2011) Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. **Animal Reproduction Science** 125:211-218.

ESHRE (1998) Andrology Special Interest Group. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. **Human Reproduction** 13:142-145.

Estrada E, Álamo MMR, Rodríguez-Gil JE, Yeste M (2017) The addition of reduced glutathione to cryopreservation media induces changes in the structure of motile subpopulations of frozen-thawed boar sperm. **Cryobiology** 78:56-64.

Farias A, Braga H, Zandoná J, Fernandes MB, Pereira JFS (2016) Efeito do reprodutor na produção *in vitro* de embriões da raça Senepol. **Biociências, Biotecnologia e Saúde** 15:233-234.

Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote, RH (1998) Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology** 49:671-679.

Ferraz MAMM, Morató R, Yeste M, Arcarons N, Pena AI, Tamargo C, Hidalgo CO, Muiño R, Mogas T (2014) Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to *in vitro* sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. **Theriogenology** 81:1067-1072.

Flores E, Taberner E, Rivera MM, Peña A, Rigau T, Miró J, Rodríguez-Gil JE (2008) Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. **Theriogenology** 70:936-945.

Flores E, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE (2009) The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. **Theriogenology** 72:784-797.

García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Ramón M, Olmo E, Jiménez-Rabadán P, Fernández-Santos MR, Anel-López L, Garde JJ, Soler AJ (2014) Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support *in vitro* capacitation and fertilization. **Reproduction, Fertility and Development** 26:725-732.

García-Herreros M, Leal CLV (2014) Comparative study of sperm washing and selection methods after cryopreservation and its influence on sperm subpopulational structure in a bovine model. **Systems Biology in Reproductive Medicine** 60:338-347.

Gonçalves RLR, Viana JHM (2019) Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 43:156-159.

Goovaerts IGF, Hoflack GG, Van Soom A, Dewulf J, Nichi M, Kruif A, Bols PEJ (2006) Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. **Theriogenology** 66:323-330.

Heinzen BC, Pereira JFS, Fernandes MB, Bruel NL, Silva JJ, Dijkinga FJ, Sotomaior CS (2014) Produção *in vitro* de embriões nas raças Red Angus, Senepol e Girolando. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**12:S41.

Holt WV, Van Look KJW (2004) Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. **Reproduction** 127:527-535.

Ibanescu I, Siuda M, Bollwein H (2020) Motile sperm subpopulations in bull semen using different clustering approaches – Associations with flow cytometric sperm characteristics and fertility. **Animal Reproduction Science** 215:106329.

Januskauskas A, Johannisson A, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H (2000) Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophorein relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. **Theriogenology** 53:859-875.

Kanno C, Sakamoto KQ, Yanagawa Y, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M (2017) Comparison of sperm subpopulation structures in first and second ejaculated semen from Japanese black bulls by a cluster analysis of sperm motility evaluated by a CASA system. **The Journal of Veterinary Medical Science** 79:1359-1365.

Kastelic JP, Thundathil JC (2008) Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals** 43:368-373.

Kathiravan P, Kalatharan J, Edwin MJ, Veerapandian C (2008) Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with *in vitro* fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal Reproduction Science** 104:9-17.

Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G (2011) Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system – a review. **Reproduction in Domestic Animals** 46:165-172.

Ledesma A, Zalazar L, Fernández-Alegre E, Hozbor F, Cesari A, Martínez-Pastor F (2017) Seminal plasma proteins modify the distribution of sperm subpopulations in cryopreserved semen of rams with lesser fertility. **Animal Reproduction Science** 184:44-50.

Marquez B, Suarez SS (2007) Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca^{2+} influx. **Biology of Reproduction** 76:660-665.

Marquez B, Suarez SS (2004) Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. **Biology of Reproduction** 70:1626-1633.

Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Herraez P, Anel L, Paz P (2005) Sperm subpopulations in Iberian Red Deer epididymal sperm and their changes though the cryopreservation process. **Biology of Reproduction** 72:316-327.

Martínez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L, Paz P (2011) Statistical series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. **Theriogenology** 75:783-795.

Maylem ERS, Leoveras EDC, Venturina EV, Atabay EP, Atabay EC (2017) Subpopulation structure and changes after cryopreservation of sperms from high and low fertility water buffalo. **Journal of Veterinary Andrology** 2:68-76.

McCullagh P, Nelder JA. **Generalized Linear Models**. 2 ed. Londres: Chapman & Hall; 1989.

Mello RRC, Ferreira JE, Sousa SLG, Mello MRB, Palhano HB (2016) Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 40:58-64.

Mortimer ST (2000) CASA-Practical Aspects. **Journal of Andrology** 21:515-524.

Mortimer ST, Mortimer D (1990) Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. **Journal of Andrology** 11:195-203.

Muiño R, Peña AI, Rodríguez A, Tamargo C, Hidalgo CO (2009) Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. **Theriogenology** 72:860-868.

Muiño R, Rivera MM, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, Peña AI (2008a) Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. **Animal Reproduction Science** 109:50-64.

Muiño R, Tamargo C, Hidalgo CO, Peña AI (2008b) Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science** 109:27-39.

Palma GA, Sinowatz F (2004) Male and female effects on the *in vitro* production of bovine embryos. **Anatomia, hystologia, embryologia** 33:257-262.

Parrish JJ (2014) Bovine *in vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology** 81:67-73.

Peña AI, Barrio M, Becerra JJ, Quintela LA, Herradón PG (2012) Motile sperm subpopulations in frozen–thawed dog semen: Changes after incubation in capacitating conditions and relationship with sperm survival after osmotic stress. **Animal Reproduction Science** 133:214-223.

Quintero-Moreno A, Miró J, Rigau AT, Rodríguez-Gil JE (2003) Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology** 59:1973-1990.

Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil, JE (2007) Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. **Reproduction in Domestic Animals** 42:312-319.

Ramón M, Soler AJ, Ortiz JA, García-Alvarez O, Maroto-Morales A, Roldan ERS, Garde JJ (2013) Sperm population structure and male fertility: an intraspecific study of sperm design and velocity in red deer. **Biology of Reproduction** 89:1-7.

Rodríguez-Martínez H (2013) Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. **Animal Reproduction** 10:148-159.

Sellem E, Broekhuijse MLWJ, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen EPC (2015) Use of combinations of *in vitro* quality assessments to predict fertility of bovine semen. **Theriogenology** 84:1447-1454.

Sharma RK, Vemulapalli S, Kohn S, Agarwal A (1997) Effect of centrifuge speed, refrigeration medium, and sperm washing medium on cryopreserved sperm quality after thawing. **Archives of Andrology** 39:33-38.

Siqueira AFP, Castro LS, Assis PM, Bicudo LC, Mendes CM, Nichi M, Visintin JA, Assumpção MEOA (2018) Sperm traits on *in vitro* production (IVP) of bovine embryos: too much of anything is good for nothing. **Plos One** 13:1-16.

Souza AK, Trautwein LGC, Paranzini CS, Perecin FM, Cardoso GS, Martins MIM (2018) Influence of cooling temperature in sperm subpopulations of domestic cats. **Animal Reproduction Science** 189:1-10.

Suarez SS, Ho H (2003) Hyperactivation of mammalian sperm. **Cellular and Molecular Biology** 49:351-356.

Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS, Aitken RJ (1995) Definition of the optimal criteria for identifying hyperactivated human spermatozoa at 25Hz using *in vitro* fertilization as a functional end point. **Human Reproduction** 10:2928-2937.

Vázquez AJF, Cedillo MJ, Quezada VJ, Rivas AC, Morales ECL, Ayala EME, Hernández MJ, González RA, Aragón MA (2015) Effects of repeated electroejaculations on kinematic sperm subpopulations and quality markers of Mexican creole goats. **Animal Reproduction Science** 154:29-38.

Viana JHM (2018a) A produção de embriões bovinos em 2017: O mercado em stand-by. **O embrião** 62:6-10.

Viana JHM (2018b) 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more *in vitro*-produced than *in vivo*-derived embryos were transferred worldwide. **Embryo Technology Newsletter** 36:8-25.

Viana JHM, Figueiredo ACS, Siqueira LGB (2017) Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, 14:476-481.

Yanagimachi R (1984) Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. **Gamete Research** 10:187-232.

Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Sánchez-Nadal JA, Santolaria P (2015) Sperm population structure in high and low field fertility rams. **Animal Reproduction Science** 156:128-134.

Yániz JL, Soler C, Alquézar-Baeta C, Santolaria P (2017) Toward an integrative and predictive sperm quality analysis in *Bos taurus*. **Animal Reproduction Science** 181:108-114.

Watanabe YF, Souza AH, Mingoti RD, Ferreira RM, Batista EOS, Dayan A (2017) Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo transfer. **Animal Reproduction** 14:635-644.

CAPÍTULO 3 – Redes neurais artificiais na estimativa da produção *in vitro* de embriões Senepol

RESUMO - Diferentes atributos dos espermatozoides são essenciais para o desenvolvimento de processos que culminam na fertilização dos oócitos e desenvolvimento embrionário. Estudar os espermatozoides da forma mais completa possível e explorar as informações obtidas com estatísticas multivariadas pode ser a chave para melhorar a estimativa da fertilidade em bovinos. Em processos não lineares as redes neurais artificiais (RNAs) são consideradas técnicas não convencionais que podem ser aplicadas devido a sua alta capacidade de aproximação a modelos não lineares. Em animais, a modelagem de RNAs já foi aplicada para calcular índices zootécnicos e, em humanos, para prever a fertilidade. Utilizar esta metodologia para estimar resultados de biotecnologias reprodutivas, como a produção *in vitro* de embriões (PIVE), em bovinos, pode ser valioso para o crescimento da pecuária em nosso país. Este estudo foi desenvolvido para buscar um modelo que estime a PIVE em animais Senepol, com base em diferentes atributos espermáticos. Trinta e oito doses comerciais de sêmen de touros Senepol foram utilizadas com base em dados retrospectivos de 386 rotinas de PIVE. Após passarem por processo de lavagem, realizado antes da fertilização *in vitro,* todas as amostras foram avaliadas pelo sistema CASA (*Computer-assisted sperm analysis*) para definição das subpopulações espermáticas. Também foi analisada a morfologia espermática por preparação úmida e avaliadas a integridade das membranas plasmática e acrossomal, o potencial mitocondrial, o status oxidativo e a resistência da cromatina, por citometria de fluxo. Em estudo anterior (Capítulo 2), foram utilizadas técnicas exploratórias de dados de agrupamento e de componentes principais que identificaram três subpopulações espermáticas que, em conjunto com as demais variáveis de qualidade espermática, passaram por análise de RNAs. A análise de RNAs gerou modelos que estimam a PIVE com 18, oito e seis variáveis espermáticas preditoras. Todos os modelos apresentaram taxa de 100% de acerto para as três categorias de produção embrionária. Sendo assim, utilizando o modelo mais simples, é possível prever a PIVE em touros Senepol com a informação das subpopulações espermáticas, integridade das membranas plasmática e acrossomal, alto potencial mitocondrial e defeitos totais.

Palavras-chave: bovino, espermatozoide, inteligência artificial, fertilidade, cinética espermática, citometria de fluxo.

1. Introdução

O exame andrológico tradicional geralmente identifica aqueles touros que apresentam déficits substanciais na fertilidade. Entretanto, muitos animais

apresentam ejaculado aparentemente normal nas avaliações de rotina, porém os índices de fertilidade são reduzidos (Kastelic e Thundathil, 2008; Rodríguez-Martínez, 2013). A rejeição e aprovação de doses de sêmen após avaliação de rotina realizada na maioria das centrais de processamento de sêmen difere em relação à avaliação utilizando sistema computadorizado de análise espermática (*Computer-assisted sperm analysis;* CASA) e citometria de fluxo, o que reflete diretamente nos índices reprodutivos e produtivos do rebanho (Vincent et al., 2012).

Nenhum teste laboratorial isolado consegue prever com precisão a capacidade de fertilização de uma amostra de sêmen. A avaliação da combinação de características espermáticas *in vitro* pode prever melhor a qualidade do sêmen do que a avaliação de um único parâmetro (Celeghini et al., 2017; Oliveira et al., 2013). Diferentes atributos espermáticos são importantes para ocorrência de processos relacionados à fertilidade, especialmente na produção *in vitro* de embriões (PIVE; Tartaglione e Ritta, 2004; Mehmood et al., 2009; Arruda et al., 2013).

Em bovinos, diferentes características espermáticas já mostraram apresentar relação com a fertilidade *in vitro*. Estudos que avaliaram a morfologia dos espermatozoides (Amann et al., 2000; Thundathil et al., 2000; Walters et al., 2005), as subpopulações espermáticas (Ferraz et al., 2014), a integridade das membranas plasmática e acrossomal (Arruda et al., 2013; Tartaglione e Ritta, 2004; Siqueira et al., 2018), o potencial de membrana mitocondrial (Siqueira et al., 2018), o status oxidativo (Silva et al., 2007; Castro et al., 2016) e o DNA (Bordignon e Smith, 1999; Fatehi et al., 2006); sugerem que essas avaliações podem definir a eficiência da PIVE.

Uma limitação dos trabalhos que avaliam diferentes características espermáticas e buscam relação com a fertilidade é que a maioria deles subestima a quantidade de informações obtidas nas avaliações do sêmen ao realizar análise estatística univariada clássica, variável por variável. Avaliações que englobam várias características ao mesmo tempo representam melhor a realidade fisiológica dos animais, visto que muitos atributos são dependentes e, portanto, não devem ser considerados isoladamente. Acredita-se que o poder de predizer a fertilidade possa ser aumentado quando uma avaliação multivariada é realizada (Ginsburg et al., 1990).

Uma opção interessante para estudar relações não lineares em relação aos métodos estatísticos tradicionais é a aplicação da análise de Redes Neurais Artificiais (RNAs). As RNAs aprendem por meio da modalidade de treinamento, o que se assemelha à forma com que o cérebro humano aprende, assimila e recorda o conhecimento em antecipação a um evento futuro (Siristatidis et al., 2016). Em animais, essa análise já foi aplicada para estimar ou prever índices zootécnicos (Gandhi et al., 2009; Behzadi e Aslaminejad, 2010; Ghazanfari et al., 2011; Pandorfi et al., 2011; Raja et al., 2012). Utilizar essa metodologia para estimar a produção de embriões oriundos da PIVE, biotecnologia responsável por gerar 92% dos embriões bovinos no Brasil em 2017, pode fornecer resultados importantes para pecuária do nosso país (Viana, 2018). Além disso, utilizar este tipo de inteligência artificial na andrologia animal abre caminho para novas aplicações dessa análise em outras áreas da medicina veterinária e em outros âmbitos da pesquisa científica.

Diante disso, o presente trabalho foi realizado para buscar, com o uso de análise estatística multivariada e inteligência artificial, um modelo para estimar a PIVE em animais Senepol com base nas diferentes avaliações seminais.

2. Material e métodos

Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da FCAV/UNESP, Jaboticabal, em 18 de agosto de 2016 (Protocolo Nº 12.807/16).

A coleta dos dados de produção embrionária, seleção e acondicionamento das amostras, descongelação e lavagem do sêmen estão descritos no item 2 (Material e métodos) do Capítulo 2.

2.1 Análises no sêmen

Logo após a descongelação, uma alíquota de sêmen foi separada para análise da morfologia espermática. Pós-lavagem, todas as amostras passaram por análise da cinética individual dos espermatozoides no CASA e análises da

integridade das membranas plasmática e acrossomal, do potencial de membrana mitocondrial, do status oxidativo e da resistência da cromatina, por citometria de fluxo, descritos no item 2 (Material e métodos) do Capítulo 2.

2.2 Análises estatísticas

A descrição individual de cada variável investigada contém médias, erro padrão da média, valores máximos e valores mínimos. Foram realizadas análises estatísticas multivariadas para caracterização das subpopulações espermáticas e para estabelecer a associação e importância dos atributos espermáticos em relação à PIVE, conforme descrição abaixo.

No Capítulo 2 está descrita a metodologia para caracterização das subpopulações espermáticas. A estrutura de grupos contida na distribuição dos espermatozoides foi investigada por análise exploratória multivariada de agrupamento por método hierárquico, enquanto que a estrutura de dependência contida nas variáveis foi explorada por análise de componentes principais (ACP). Para classificar os espermatozoides de acordo com seus padrões de cinética foi aplicada análise de agrupamento não-hierárquica processada com o algoritmo k-médias e três subpopulações espermáticas foram caracterizadas. A SBP1 apresenta movimento rápido e progressivo, a SBP2 apresenta movimento rápido e não progressivo, o que pode configurar movimento de hiperativação, e a SBP3 é caracterizada por movimento lento e não progressivo.

2.2.1 Redes neurais artificiais (RNAs)

Haykin (2001) define RNA como sendo um processador maciço e paralelamente distribuído, constituído de unidades de processamento simples, que têm a propensão natural para armazenar conhecimento experimental e aplicá-lo para resolver problemas. As RNAs são modelos computacionais desenvolvidos para simular a maneira pela qual o cérebro humano processa dados. Consiste em redes de neurônios virtuais altamente interconectados que podem aceitar recursos de entrada e produzir uma decisão de saída com base em sua "experiência". Assim, as

RNAs aprendem por processo de treinamento específico e tomam uma decisão com base nessa experiência (Fogel, 2008). A propriedade mais importante das redes neurais é a habilidade de aprender de seu ambiente e com isso melhorar seu desempenho. O processo chega ao final quando a rede atinge uma solução generalizada para aquele problema. Além disso, as RNAs são usadas para classificar e reconhecer padrões com precisão (Ramesh et al., 2004).

Para a realização da análise das RNAs, a variável-resposta produção de embriões foi categorizada em alta (taxas entre 30 e 60%), média (taxas entre 20 e 29,99%) e baixa produção embrionária (taxas entre 0 e 19,99%), conforme descrito no item 2.6 (Material e métodos) do Capítulo 2. Com essa categorização, 11 amostras ficaram na categoria alta produção embrionária, 14 na média e 13 na baixa. A diferença entre as três categorias foi confirmada pelo procedimento GLM ($P<0,05$).

Para estudar a associação dos atributos espermáticos em relação à PIVE, inicialmente foram utilizadas todas as variáveis de qualidade espermática avaliadas, o que inclui todas as subpopulações espermáticas identificadas e todas as categorias de espermatozoides resultantes das avaliações no citômetro de fluxo e da avaliação da morfologia espermática (SBP1, SBP2, SBP3, DT, DMA, DME, PIAI, PIAL, PLAI, PLAL, APM, BPM, IP-VD+, IP-VD-, IP+VD+, IP+VD-, LA+ e LA-). Após, com o intuito de reduzir o número de variáveis preditoras sem perder a resposta das avaliações realizadas, oito variáveis foram selecionadas e utilizadas nas análises, o que incluiu todas as subpopulações espermáticas identificadas em conjunto com as variáveis PIAI, APM, IP-VD- e LA-, que representam uma categoria de espermatozoide de cada análise realizada no citômetro de fluxo e DT que representa o resultado total de defeitos avaliados na morfologia espermática. Foi testada também uma análise com somente seis variáveis, com o propósito de criar um modelo mais simples de ser realizado. Esse modelo não necessita do uso de citometria de fluxo, sendo possível obter o resultado com o uso de microscopia de epifluorescência. As seis variáveis preditoras escolhidas incluem as três subpopulações espermáticas e as variáveis PIAI, APM e DT.

A descrição detalhada e o princípio da metodologia das RNAs foram bem explicados por Zupan (1994). Em nosso trabalho, todos os modelos de RNAs

propostos utilizaram redes alimentadas com múltiplas camadas (*feedforward*), que possuem uma camada de entrada e várias camadas ocultas contendo vários neurônios. Cada neurônio processa a informação recebida e transfere essa informação adiante por meio de uma função de ativação para uma camada de saída. A camada C1 é a camada de entrada, as camadas C2 e C3 são as camadas internas e a camada C4 é a camada de saída. Na entrada, a função de ativação foi a linear, nas camadas internas, a função de ativação foi a hiperbólica, não linear, que trabalha em soluções complexas e, na camada de saída, a função foi a Softmax, que é aplicada em problemas de classificação, o que essencialmente dá a probabilidade da entrada estar em uma determinada classe. Nessa análise foi utilizada a aprendizagem supervisionada, em que um agente externo indica à rede a resposta desejada (categoria de produção embrionária) para o padrão de entrada (variáveis preditivas). Os valores de saída são comparados com a resposta correta para computar o valor do erro, que é então alimentado de volta na rede (retropropagação do erro) e um algoritmo ajusta os pesos de cada conexão para reduzir o valor do erro. A taxa de aprendizagem é uma constante positiva, que corresponde à velocidade do aprendizado, sendo que foram testados valores de 0,1 a 1,0. A taxa de aprendizagem definida pelo software da rede foi de 0,1. O número de ciclos define o número de vezes em que o conjunto de treinamento é apresentado à rede. Conforme Haykin (2001) foram testados valores entre 500 e 3000 ciclos de treinamento, sendo que um número excessivo de ciclos pode levar a rede à perda do poder de generalização (overfitting) e por outro lado, com um pequeno número de ciclos a rede pode não chegar ao seu melhor desempenho (underfitting). Após análise pelo software a rede foi treinada com 2000 ciclos.

3. Resultados

A taxa média de produção embrionária para as 38 amostras foi de 24,95 ± 1,61 (média ± erro padrão da média; %); valor estabelecido após análise de 386 observações e calculado com base no número de oócitos totais. Na Tabela 1 são apresentados os resultados da análise da morfologia espermática e das quatro análises realizadas no citômetro de fluxo, pós-lavagem, em todas as amostras.

Tabela 1 Morfologia espermática avaliada pós-descongelação, e integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, status oxidativo e resistência da cromatina, avaliadas em 38 amostras de sêmen de touros Senepol, pós-lavagem para fertilização *in vitro*.

Variáveis analisadas	Valor mínimo	Média ± EPM	Valor máximo
DT (%)	7,0	15,9 ± 1,0	36,5
DMA (%)	0,5	9,4 ± 1,1	35,0
DME (%)	1,5	6,5 ± 0,4	11,5
PIAI (%)	9,9	35,2 ± 2,9	76,0
PIAL (%)	0,8	3,2 ± 0,3	8,7
PLAI (%)	3,9	14,9 ± 1,6	49,1
PLAL (%)	12,4	46,7 ± 3,5	83,4
APM (%)	0,6	41,4 ± 3,9	90,5
BPM (%)	9,5	58,6 ± 3,9	99,4
IP-VD+ (%)	0,1	8,5 ± 1,6	38,3
IP-VD- (%)	8,3	26,6 ± 2,2	58,8
IP+ VD+ (%)	0,04	11,6 ± 3,1	66,2
IP+VD- (%)	0,9	53,3 ± 4,0	88,3
LA+ (%)	0,02	0,1 ± 0,01	0,3
LA- (%)	99,7	99,9 ± 0,01	100,0

Abreviações: DT: defeitos totais; DMA: defeitos maiores; DME: defeitos menores; PIAI: membranas plasmática e acrossomal íntegras; PIAL: membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada; PLAI: membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra; PLAL: membranas plasmática e acrossomal lesionadas; APM: alto potencial mitocondrial; BPM: baixo potencial mitocondrial; IP-VD+: membrana plasmática íntegra e com estresse oxidativo; IP-VD-: membrana plasmática íntegra e sem estresse oxidativo; IP+VD+: membrana plasmática lesionada e com estresse oxidativo; IP+VD-: membrana plasmática lesionada e sem estresse oxidativo; LA+: baixa resistência da cromatina; LA-: alta resistência da cromatina; EPM: erro padrão da média.

No processamento de RNAs o modelo com 18 preditores (SBP1, SBP2, SBP3, DT, DMA, DME, PIAI, PIAL, PLAI, PLAL, APM, BPM, IP-VD+, IP-VD-, IP+VD+, IP+VD-, LA+ e LA-) apresentou taxa de 100% de acerto para as três categorias de produção embrionária (alta, média e baixa). O modelo com oito preditores (SBP1, SBP2, SBP3, PIAI, APM, IP-VD-, LA- e DT), na fase de teste da análise de RNAs, também apresentou taxa de 100% de acerto para as três categorias de produção embrionária. O modelo com seis preditores (SBP1, SBP2, SBP3, PIAI, APM e DT) também foi testado e apresentou taxa de 100% de acerto para as três categorias de produção embrionária. O modelo resultante contendo uma camada de entrada com seis variáveis, duas camadas internas com seis neurônios cada e uma camada de saída com três categorias é ilustrado na Figura 1. É possível

afirmar após análise de RNAs com os três modelos propostos que a separação entre as três categorias mostrou ser não linear.

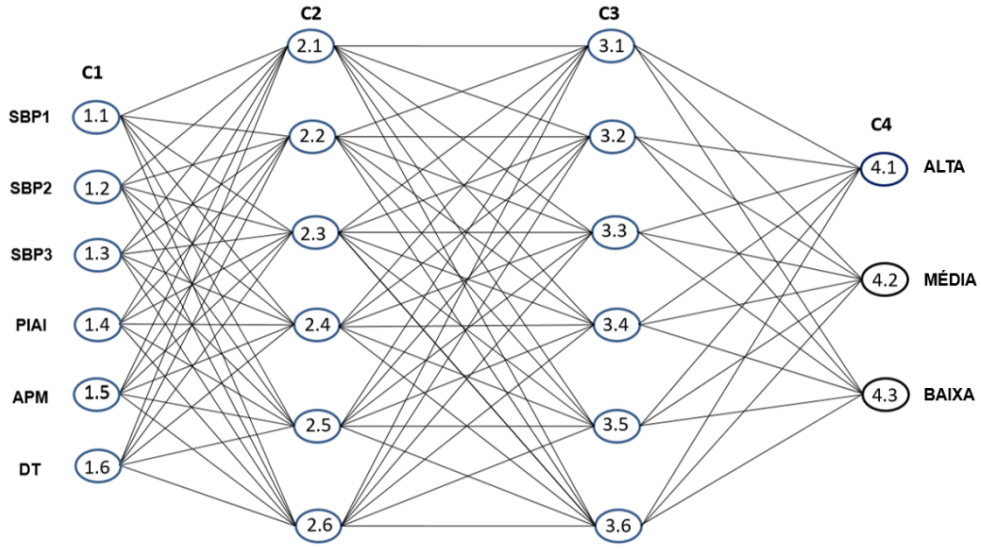

Figura 1. Ilustração do modelo de redes neurais artificiais com seis variáveis (SBP1, SBP2, SBP3, PIAI, APM e DT) para estimativa das três categorias de produção *in vitro* de embriões (alta, média e baixa) na raça Senepol.
Abreviações: SBP1: subpopulação espermática 1; SBP2: subpopulação espermática 2; SBP3: subpopulação espermática 3; PIAI: membranas plasmática e acrossomal íntegras; APM: alto potencial mitocondrial; DT: defeitos totais.

4. Discussão

A previsão da fertilidade em touros exige conhecimento prático dos procedimentos estatísticos e da biologia reprodutiva, a fim de evitar conclusões sem sentido ou errôneas (Matthew, 2016). Este trabalho é o primeiro que utiliza inteligência artificial, por meio de análise de RNAs, para estimar a PIVE em touros. Uma vez que a relação de dependência entre as variáveis e a PIVE não é linear e, que modelos de RNAs funcionam bem nestes casos, foi possível gerar diferentes modelos para estimar a PIVE em touros Senepol.

Alguns trabalhos em humanos relataram que é possível estimar a fertilidade com o uso da análise de RNAs. Neiderberger et al. (1993) relataram que essa metodologia pode ser empregada com sucesso para prever o potencial de fertilidade

em humanos, visto que esta análise de dados apresentou melhores resultados que a análise discriminante linear e quadrática para predição da fertilidade, avaliada pelo ensaio de penetração em muco cervical bovino e ensaio de penetração em oócitos livres de zona pelúcida. Milewski et al. (2009) relataram que com o uso das RNAs é possível prever a falha de tratamentos reprodutivos nos pacientes com quase 90% de certeza. Durairaj e Thamiselvan (2013) observaram que o uso das RNAs permitiu precisão de 73% em relação ao resultado da taxa de sucesso do tratamento de fertilização *in vitro* (FIV). Milewski et al. (2013) criaram um modelo com essa metodologia que prediz corretamente cerca de 70% das gestações. Estudo de Siristatidis et al. (2016) propôs um modelo funcional de previsão da FIV em humanos, com o uso das RNAs, para auxiliar os médicos a adaptar o tratamento de casais subférteis e melhorar o resultado da reprodução assistida.

Em animais, as RNAs foram aplicadas para prever produção de leite em vacas (Grzesiak et al., 2003; Gandhi et al., 2009) e em cabras (Fernandez et al., 2007), crescimento em ovelhas (Behzadi e Aslaminejad, 2010), produção de ovos de galinhas poedeiras (Ghazanfari et al., 2011), peso ao nascimento de leitões e número de leitões mumificados (Pandorfi et al., 2011) e peso corporal de cabras (Raja et al., 2012). Especificamente, na área de andrologia animal, há poucos trabalhos que utilizaram as RNAs. Há um estudo que utilizou esta análise para identificar três subpopulações espermáticas no sêmen de gatos, com base na cinética dos espermatozoides, além de observar diferenças antes (espermatozoides da cauda do epidídimo) e após a ejaculação (espermatozoides do ejaculado) nas características das subpopulações (Contri et al., 2012). Deb et al. (2015) relataram que a metodologia das RNAs pode ser utilizada para prever a motilidade pós-descongelação dos espermatozoides em touros mestiços.

Não foram encontrados trabalhos que estudaram subpopulações espermáticas em touros como variável para estimar a PIVE, com o uso da inteligência artificial. Porém, já foi sugerido que a presença de uma subpopulação rápida e linear seria a mais adequada para realizar a fertilização (Quintero-Moreno et al., 2003; Muiño et al., 2008; Yániz et al., 2015). Estudo de Ferraz et al. (2014) sugere que a presença de alta porcentagem de espermatozoides que se movem rápida e progressivamente no ejaculado de touros é positivamente correlacionada

com a fertilidade *in vitro*, avaliada em ensaio de penetração na zona pelúcida. Alguns estudos relataram que espermatozoides com movimento hiperativado, característico da SBP2, também exercem efeito positivo sobre os resultados de produção embrionária (Donnelly et al., 1998; Sukcharoen et al., 1995; García-Álvarez et al., 2014). Em relação à SBP3, visto que é uma subpopulação com características oposta à SBP1, possivelmente seu impacto sobre a produção embrionária seja negativo. De qualquer forma, o modelo mais simples para estimar a PIVE, que obteve 100% de acerto nas categorias de produção embrionária, apresenta a avaliação das subpopulações espermáticas como variável preditora, evidenciando que elas exercem efeito sobre a PIVE.

As demais características de qualidade do espermatozoide já foram avaliadas com o intuito de estimar a fertilidade em touros. Em estudo de Kumaresan et al. (2017) foi relatado que uma avaliação abrangente de diferentes aspectos das funções espermáticas e subsequente análise estatística multivariada indica que o sêmen de touros abaixo da média da fertilidade difere na integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, status oxidativo e integridade do DNA. Os mesmos autores criaram um modelo com essas características para predizer a taxa de não retorno ao estro aos 56 dias. Oliveira et al. (2013) relataram que as variáveis PIAI, DMA e DT podem ser utilizadas como preditoras importantes da taxa de concepção com base nos resultados de campo de um programa de inseminação artificial (IA) em tempo fixo. Siqueira et al. (2018) relataram que ao observar de forma isolada, porcentagens mais baixas de integridade acrossomal e potencial mitocondrial resultaram em maiores taxas de blastocistos em bovinos.

A integridade das membranas plasmática e acrossomal é importante para que diferentes processos fisiológicos relacionados à fertilização ocorram, dentre eles a capacitação espermática, a reação acrossomal, a hiperativação, a ligação à zona pelúcida do oócito e a fusão dos gametas (Maziero et al., 2009). A integridade dessas membranas são cruciais em diferentes processos que envolvem a fertilização e era esperado que sua permanência no modelo mais simples de estimativa fosse importante para manter o resultado de 100% de acerto em relação as categorias de produção embrionária. Outro estudo relatou que a avaliação concomitante da integridade das membranas plasmática e acrossomal dos

espermatozoides representam alta proporção na variação da fertilidade *in vitro* em bovinos, sendo importante realizar análises que avaliem essas estruturas para prever o potencial de amostras de sêmen de touros usadas para FIV ou IA (Tartaglione e Ritta, 2004). Com relação ao acrossoma, não somente sua integridade, mas a ausência da reação acrossomal e reação acrossomal incompleta ou prematura reduzem a capacidade de fertilização *in vitro* (Blottner et al., 1990; Palomo et al., 2016).

A avaliação mitocondrial também pode ser um preditor útil de fertilidade com base em sua relação com a motilidade (Matthew, 2016). Em nosso estudo a variável alto potencial mitocondrial foi mantida no modelo mais simples e manteve o resultado de 100% em estimar a PIVE. O metabolismo energético mitocondrial é um fator-chave que suporta várias funções espermáticas, incluindo a capacidade de mobilidade e fertilização (Flesch e Gadella, 2000; Graham e Mocé, 2005). Kasai et al. (2002) observaram, em humanos, que à medida que o potencial da membrana mitocondrial aumenta, os parâmetros de motilidade total, VAP, VCL e porcentagem de espermatozoides hiperativados também aumentam, juntamente com seu potencial de fertilidade, visto que taxas de fertilização *in vitro* são maiores no sêmen com maior potencial mitocondrial.

Neste estudo, quando retirada a variável que representa o status oxidativo, para reduzir o modelo na análise de RNAs, sua ausência não interferiu na porcentagem de acerto do modelo. Possivelmente, o resultado do potencial mitocondrial já reflita de forma indireta o status oxidativo da célula e seu efeito sobre a PIVE, visto que uma importante fonte de geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs) em células somáticas envolva a cadeia de transporte de elétrons mitocondriais durante a respiração celular (Boveris e Chance, 1973; Koppers et al., 2008). Espermatozoides com alto potencial mitocondrial exibem maior potencial para liberar agentes pró-oxidantes (Castro et al., 2016). Siqueira et al. (2018) relataram que menor potencial de membrana mitocondrial proporciona maiores taxas de desenvolvimento embrionário e blastocistos em bovinos, sugerindo que o efeito negativo de um maior potencial mitocondrial ocorra devido à maior geração de EROs no ambiente de fertilização *in vitro*, resultando em danos oxidativos aos gametas e zigotos iniciais. A importância em realizar a avaliação do potencial mitocondrial e

utilizá-la em um modelo que estime a PIVE, possivelmente se estabelece devido ao seu efeito sobre a fertilização de forma diferente dependendo da sua intensidade.

Quando a variável preditora da análise de resistência da cromatina foi retirada, também não houve alteração do resultado de 100% de acerto do modelo. Já foi relatado que a análise de fragmentação do DNA não melhora a predição da fertilidade, avaliada pela taxa de não retorno ao estro após IA (Christensen et al., 2011). Em relação à PIVE, Simões et al. (2013) relataram que os resultado do SCSA não apresentaram correlação com a taxa de clivagem e a taxa de blastocistos em bovinos. Segundo Karoui et al. (2012) valores de fragmentação de DNA entre 7% e 10% são indicativos de baixo sucesso na IA em touros, pois os danos no DNA podem comprometer o desenvolvimento embrionário. As amostras utilizadas em nosso experimento são doses de sêmen comerciais e era esperado que os resultados quanto a avaliação do DNA fossem bons, visto que essas partidas já foram extensivamente utilizadas em diferentes sistemas de reprodução e não resultaram em problemas em relação à fertilidade. Portanto, pode-se especular que o efeito dessa variável é reduzido por não existir muita variação entre as amostras e seus valores de resistência da cromatina serem satisfatórios.

Em nosso trabalho, a porcentagem de defeitos totais foi uma das variáveis preditoras que contribuiu para acerto de 100% do modelo mais simples de RNAs. Anormalidades morfológicas estão sempre presentes em qualquer ejaculado, mas diferem em seu impacto na fertilidade. Existem os defeitos que interferem desde o transporte e função dos espermatozoides no aparelho reprodutor feminino até o início da fertilização e bloqueio da polispermia e aqueles defeitos que interferem principalmente na manutenção da fertilização e no início da embriogênese (Freneau, 2011). Estudo de Walters et al. (2005) forneceu evidências de que espermatozoides morfologicamente anormais têm um impacto negativo sobre a FIV e o desenvolvimento embrionário, ao relatar que um aumento na porcentagem de espermatozoides com cabeça piriforme, em combinação com vacúolos apicais e diademas foram associados à diminuição no percentual dos embriões que clivaram, levando a redução na taxa de desenvolvimento e formação de blastocistos. Defeitos acrossômicos resultam em baixa fertilidade *in vitro*, principalmente devido à menor capacidade dos espermatozoides de se fundir com o oolema, penetrar no ooplasma

e descompactar o DNA (Thundathil et al., 2001). Já foi relatado que o defeito de acrossoma "knobbed" interfere nos resultados da PIVE em bovinos ao comprometer sua ligação e penetração na zona pelúcida do oócito (Thundathil et al., 2000).

É importante salientar que se a relação fosse avaliada com outro tipo de estratégia reprodutiva, possivelmente o resultado seria diferente. Na fertilização *in vitro* os espermatozoides são colocados em proximidade ao oócito, sem a necessidade de atravessar qualquer parte do trato reprodutivo da fêmea, portanto os defeitos morfológicos que interferem na motilidade espermática possivelmente apresentam efeito menor sobre os resultados da PIVE do que aqueles que interferem na penetração do espermatozoide no oócito e no desenvolvimento embrionário. Entretanto, o consenso é de que maior quantidade de espermatozoides sem defeitos morfológicos é o desejável para obter maior fertilidade. A alta frequência de espermatozoides morfologicamente anormais ou a alta incidência de um único defeito podem reduzir a fertilidade; sendo que alteração morfológica é uma das características que mais se correlaciona com fertilidade (Donnelly et al., 1998; Walters et al., 2005; Al-Makhzoomi et al., 2008; Arruda et al., 2011; Nagy et al., 2013). Alguns trabalhos já relataram que a proporção de espermatozoides morfologicamente normais no ejaculado de um touro está relacionada à sua fertilidade após IA (Al-Makhzoomi et al., 2008; Nagy et al., 2013).

Diferentes estudos relataram correlações positivas entre a PIVE e a fertilidade *in vivo* em bovinos (Lonergan, 1994; Larsson e Rodríguez-Martínez, 2000; Ward et al., 2001; Sudano et al., 2011). Porém, outros trabalhos já observaram que os resultados obtidos *in vitro* não garantem os mesmos resultados a campo (Vandaele et al., 2006; Utt, 2016; Puglisi et al., 2004). Possivelmente, o efeito dos atributos espermáticos seja diferente se for realizada a mesma avaliação para estimar a fertilidade *in vivo* em bovinos. É importante ressaltar que estes resultados mostraram algumas variáveis importantes para explicar a PIVE, entretanto estes modelos precisam ser validados com um número maior de amostras e de touros, em outras raças e populações, para confirmar se de fato essas variáveis servem para explicar a taxa de produção embrionária em um conjunto de dados diferentes.

Com o presente trabalho foi possível observar que com o uso das RNAs é possível estimar a PIVE em animais Senepol, com uma análise que combina a

avaliação das subpopulações espermáticas, integridade das membranas plasmáticas e acrossomal, potencial mitocondrial e morfologia espermática. Mais estudos devem ser realizados com aplicação da análise de RNAs para estimar a fertilidade em maior número de touros e com base em outros meios de reprodução em bovinos, como IA e monta natural, além de outras raças.

5. Conclusões

As RNAs geraram modelos para estimar a PIVE com 18, oito e seis variáveis, sendo que o modelo mais simples inclui as três subpopulações espermáticas e as variáveis de integridade das membranas plasmática e acrossomal, alto potencial mitocondrial e defeitos totais como preditores, com 100% de acerto.

6. Referências

Al-Makhzoomi A, Lundeheim N, Håård M, Rodríguez-Martínez H (2008) Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. **Theriogenology** 70:682-691.

Amann RP, Seidel Júnior GE, Mortimer RG (2000) Fertilizing potential *in vitro* of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. **Theriogenology** 54:1499-1515.

Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaimes JD (2011) Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 35:145-151.

Arruda RLP, Zúccari CESN, Fernandes CE, Abreu UGP, Costa e Silva EV (2013) Características do sêmen congelado relacionadas à fertilidade *in vitro* em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 37:72-80.

Blottner S, Nehring H, Torner H (1990) Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin *in vitro*: relationship to fertility. **Theriogenology** 34:619-628.

Behzadi MRA, Aslaminejad AA (2010) A comparison of neural network and nonlinear regression predictions of sheep growth. **Journal of Animal and Veterinary Advances** 9:2128–2131.

Bordignon V, Smith LC (1999) Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest pre implantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. **Biology of Reproduction** 61:1513-1520.

Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal** 134:707-716.

Castro LS, Assis PM, Siqueira AFP, Hamilton TRS, Mendes CC, Losano JDA, Nichi M, Visintin JA, Assumpção MEOA (2016) Sperm oxidative stress in detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2016:1-12.

Celeghini ECC, Arruda RP, Florez-Rodriguez SA, Santos FB, Alves MBR, Oliveira BMM (2017) Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 41:40-45.

Christensen P, Labouriau R, Birck A, Boe-Hansen GB, Pedersen J, Borchersen S (2011) Relationship among seminal quality measures and field fertility of young dairy bulls using low-dose inseminations. **Journal of Dairy Science** 94:1744-1754.

Contri A, Zambelli D, Faustini M, Cunto M, Gloria A, Carluccio A (2012) Artificial neural networks for the definition of kinetic subpopulations in electroejaculated and epididymal spermatozoa in the domestic cat. **Reproduction** 144:339-347.

Deb R, Singh U, Raja TV, Kumar S, Tyagi S, Alyethodi RR, Alex R, Sengar G, Sharma S (2015) Designing of an artificial neural network model to evaluate the association of three combined Y-specific microsatellite loci on the actual and predicted post thaw motility in crossbreed bull semen. **Theriogenology** 83:1445-1450.

Donnelly ET, Lewis SEM, McNally JA, Thompson W (1998) *In vitro* fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. **Fertility and Sterility** 70:305-314.

Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BAJ, Colenbrander B, Gadella BM (2006) DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology** 27:176-188.

Fernandez C, Soria E, Sanchez-Seiquer P, Gómez-Chova L, Magdalena R, Martín JD, Navarro MJ, Serrano AJ (2007) Weekly milk prediction on dairy goats using neural networks. **Neural Computing and Applications** 16:373–381.

Ferraz MAMM, Morató R, Yeste M, Arcarons N, Pena AI, Tamargo C, Hidalgo CO, Muiño R, Mogas T (2014) Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to *in vitro* sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. **Theriogenology** 81:1067-1072.

Fogel GB (2008) Computational intelligence approaches for pattern discovery in biological systems. **Briefings in Bioinformatics** 9:307-316.

Flesch FM, Gadella BM (2000) Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta** 1469:197-235.

Freneau GE (2011) Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 35:160-170.

Gandhi RS, Raja TV, Ruhil AP, Kumar A (2009) Prediction of lifetime milk production using artificial neural network in Sahiwal cattle. **Indian Journal of Animal Sciences** 79:1038-1040.

Ghazanfari S, Nobari K, Tahmoorespur M (2011) Prediction of egg production using artificial neural network. **Iranian Journal of Applied Animal Science** 1:11–16.

Ginsburg KA, Sacco AG, Ager JW, Moghissi KS (1990) Variation of movement characteristics with washing and capacitation of spermatozoa. II. Multivariate statistical analysis and prediction of sperm penetrating ability**. Fertility and Sterility** 53:704-708.

Graham JK, Mocé E (2005) Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology** 64:492-504.

Grzesiak W, Lacroix R, Wójcik J, Blaszczyk P (2003) A comparison of neural network and multiple regression predictions for 305-day lactation yield using partial lactation records. **Canadian Journal of Animal Science** 83:307–310.

Haykin S (2001) **Redes Neurais**: Princípios e Prática. 2ª ed. Porto Alegre: Bookman.

Karoui S, Díaz C, González-Marín C, Amenabar M, Serrano M, Ugarte E, Gosálvez J, Roy R, López-Fernández C and Carabaño M (2012) Is sperm DNA fragmentation a good marker for field AI bull fertility? **Journal of Animal Science** 90:2437-2449.

Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K (2002) Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. **Asian Journal of Andrology** 4:97-103.

Kastelic JP, Thundathil JC (2008) Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals** 43:368-373.

Koppers AJ, De Luliis GN, Finnie JM, Mclaughlin EA, Aitken RJ (2008) Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 93:3199-3207.

Kumaresan A, Johannisson A, Al-Essawe EM, Morrell JM (2017) Sperm viability, reactive oxygen species, and DNA fragmentation index combined can discriminate between above- and below-average fertility bulls. **Journal of Dairy Science** 100:5824-5836.

Larsson B, Rodríguez-Martínez H (2000) Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science** 60-61:327-336.

Lonergan P (1994) The application of *in vitro* fertilization techniques to the prediction of bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals** 29:12-21.

Matthew DU (2016) Prediction of bull fertility. **Animal Reproduction Science** 169:37-44.

Maziero RRD, Crespilho AM, Freitas-Dell'Aqua, CP, Dell'Aqua Junior JA, Papa FO (2009) Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 6:5-10.

Mehmood A, Anwar M, Saqlan Naqvi SM (2009) Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. **Animal Reproduction Science** 111:141-148.

Muiño R, Rivera MM, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, Peña AI (2008) Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. **Animal Reproduction Science** 109:50-64.

Nagy S, Johannisson A, Wahlsten T, Ijäs R, Andersson M, Rodriguez-Martinez H (2013) Sperm chromatin structure and sperm morphology: their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. **Theriogenology** 79:1153-1161.

Neiderberger CS, Lipshultz LI, Lamb DJ (1993) A neural network to analyze fertility data. **Fertility and Sterility** 60:324-330.

Oliveira LZ, Arruda RP, Andrade AFC, Celeghini ECC, Reeb PD, Martins JPN, Santos RM, Beletti ME, Peres RFG, Monteiro FM, Hossepian de Lima VFM (2013) Assessment of *in vitro* sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal Reproduction Science** 137:145-155.

Palomo MJ, Quintanilla R, Izquierdo MD, Mogas T, Paramio MT (2016) Variability in *in vitro* fertilization outcomes of prepubertal goat oocytes explained by basic semen analyses. **Zygote** 24:831-838.

Pandorfi H, Silva IJO, Sarnighausen VCR, Vieira FMC, Nascimento ST, Guiselini C (2011) Uso de redes neurais artificiais para predição de índices zootécnicos nas fases de gestação e maternidade na suinocultura. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40:676-681.

Puglisi R, Balduzzi D, Galli A (2004) *In vitro* sperm penetration speed and its relationship with *in vivo* bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals** 39:424-428.

Quintero-Moreno A, Miró J, Teresa Rigau AT, Rodríguez-Gil JE (2003) Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology** 59:1973-1990.

Raja TV, Ruhil AP, Gandhi RS (2012) Comparison of connectionist and multiple regression approaches for prediction of body weight of goats. **Neural Computing and Applications** 21:119-124.

Ramesh AN, Kambhampati C, Monson JR, Drew PJ (2004) Artificial intelligence in medicine. **Annals of the Royal College of Surgeons of England** 86:334-338.

Rodríguez-Martínez H (2013) Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. **Animal Reproduction** 10:148-159.

Silva PFN, Gadella BM, Colenbrander B, Roelen BAJ (2007) Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. **Theriogenology** 67:609-619.

Simões R, Feitosa WB, Siqueira AFP, Nichi M, Paula-Lopes FF, Marques MG, Peres MA, Barnabe VH, Visintin JA, Assumpção MEO (2013) Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo *in vitro* development outcome. **Reproduction** 146:433-441.

Siqueira AFP, Castro LS, Assis PM, Bicudo LC, Mendes CM, Nichi M, Visintin JA, Assumpção MEOA (2018) Sperm traits on *in vitro* production (IVP) of bovine embryos: too much of anything is good for nothing. **Plos One** 13:1-16.

Siristatidis C, Vogiatzi P, Pouliakis A, Trivella M, Papantoniou N, Bettocchi S (2016) Prediction IVF outcome: A proposed web-based system using artificial intelligence. **In vivo** 30:507-512.

Sudano MJ, Crespilho AM, Fernandes CB, Martins Junior A, Papa FO, Rodrigues J, Machado R, Landim-Alvarenga FC (2011) Use of bayesian inference to correlate *in vitro* embryo production and *in vivo* fertility in zebu bulls. **Veterinary Medicine International** 2011:1-6.

Tartaglione CM, Ritta MN (2004) Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology** 62:1245-1252.

Thundathil J, Meyer R, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ (2000) Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. **Theriogenology** 54:921-934.

Thundathil J, Palomino J, Barth A, Mapletoft R, Barros C (2001) Fertilizing characteristics of bovine sperm with flattened or indented acrosomes. **Animal Reproduction Science** 67:231-243.

Utt MD (2016) Prediction of bull fertility. **Animal Reproduction Science** 169:37-44.

Vandaele L, Mateusen B, Maes D, Kruif A, Van Soom A (2006) Is apoptosis in bovine *in vitro* produced embryos related to early developmental kinetics *and in vivo* bull fertility? **Theriogenology** 65:1691-1703.

Viana JHM (2018) A produção de embriões bovinos em 2017: O mercado em stand-by. **O embrião** 62:6-10

Vincent P, Underwood SL, Dolbec C, Bouchard N, Kroetsch T, Blondin P (2012) Bovine semen quality control in artificial inseminations centers. **Animal Reproduction** 9:153-165.

Walters AH, Eyestone WE, Saacke RG, Pearson RE, Gwazdauskas FC (2005) Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. **Theriogenology** 63:1925-1937.

Ward F, Rizos D, Corridan D, Quinn K, Boland M, Lonergan P (2001) Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility *in vivo*. **Molecular Reproduction and Development** 60:47-55.

Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Sánchez-Nadal JA, Santolaria P (2015) Sperm population structure in high and low field fertility rams. **Animal Reproduction Science** 156:128-134.

Zupan J (1994) Introduction to artificial neural network (ANN) methods: What they are and how to use them. **Acta Chimica Slovenica** 41:327-352.