

**UNIVERSIDADE BRASIL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINARIA
CAMPUS FERNANDÓPOLIS**

JOÃO GABRIEL TOGNOLI MARINO

**CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE TOUROS E SUAS RELAÇÕES
COM A TAXA DE FERTILIDADE A CAMPO – REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA**

Fernandópolis– SP

2023

JOÃO GABRIEL TOGNOLI MARINO

**CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE TOUROS E SUAS RELAÇÕES
COM A TAXA DE FERTILIDADE A CAMPO – REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de BACHAREL em MEDICINA VETERINÁRIA

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Amanda Prudêncio Lemes

Fernandópolis - SP
2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

M293c Marino, João Gabriel Tognoli.

Características seminais de touros e suas relações com a taxa de fertilidade a campo: revisão bibliográfica / João Gabriel Tognoli Marino / Fernandópolis - SP Universidade Brasil, 2023.

32.il; 29,5cm.

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Banca Examinadora da Universidade Brasil - Campus Fernandópolis, como parte dos requisitos- os para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador(a): Prof. Dra. Amanda Prudêncio Lemes

1.Características seminais. 2. Sêmen. 3. Touro. 4. Testes laboratoriais.

I. Título.

CDD 636.08926

TERMO DE APROVAÇÃO

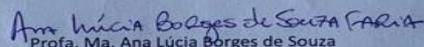


**UNIVERSIDADE
BRASIL**

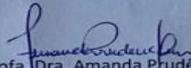
ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao 05º dia do mês de dezembro de 2023, sob presidência do(a) Prof.(a). Dra. Amanda Prudêncio Lemes, em sessão pública, reuniram-se de modo presencial na Universidade Brasil Campus Fernandópolis, Estrada Projetada F1, Faz. Santa Rita, a Comissão Examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso de **João Gabriel Tognoli Marino**, aluno(a) regular e matriculado(a) no curso de Medicina Veterinária, do Campus Fernandópolis/SP. Iniciando os trabalhos, o(a) candidato(a) apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **"CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE TOUROS E SUAS RELAÇÕES COM A TAXA DE FERTILIDADE A CAMPO"**

Terminada a apresentação, procedeu-se o julgamento da prova onde verificou-se que o(a) candidato(a) foi APROVADO pela banca examinadora abaixo constituída. Do que constar, lavrou-se a presente ATA que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Examinadora e pelo Supervisor de Estágios e de Trabalho de Conclusão do Curso de Medicina Veterinária.


Profa. Ma. Ana Lúcia Borges de Souza
Membro Examinador


Prof. Dr. Raphael Chiarelo Zero
Membro Examinador


Profa. Dra. Amanda Prudêncio Lemes
Presidente da Banca - orientador(a)


Prof. Dr. Raphael Chiarelo Zero
**Coordenador do Curso de Medicina Veterinária
UNIVERSIDADE BRASIL
Fernandópolis - SP**

Campus Fernandópolis
Estrada Projetada F1, s/n, Fazenda Santa Rita - Fernandópolis/SP | 15600-000
Central de Relacionamento com o Aluno - 08007807070
www.ub.edu.br

DEDICATÓRIA

Neste pequeno, mas sincero texto, dedico este trabalho a Deus, autor de maravilhas em minha vida, cuja presença me auxilia nas minhas escolhas, abrindo caminhos e me segurando pela mão, me dando confiança frente aos desafios e adversidades, me acompanhando rumo à realização dos meus sonhos. Sem Deus, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por todo apoio durante minha jornada na minha graduação, que, sem dúvidas nenhuma, é a minha paixão, aos docentes da Universidade Brasil campus Fernandópolis, em especial minha orientadora, Prof. Dr^a. Amanda Prudêncio Lemes, por todo empenho e apoio nesses cinco anos de jornada, ao Dr. Leonardo T. N. Bashiyo pelos ensinamentos e troca de experiências na área de clínica e cirurgia em pequenos animais, ao Dr. Eduardo Cunha Cavassan pelos ensinamentos e troca de experiências na área de reprodução de grandes animais.

RESUMO

O aumento do uso de biotecnologias da reprodução associado a maior demanda de produção tem determinado a otimização dos protocolos hormonais para as vacas e novilhas de corte. Nesse contexto, a escolha do material genético, ou seja, o sêmen que será utilizado, é de caráter fundamental para que as taxas de concepção se tornem cada vez mais elevadas. A escolha do sêmen a ser utilizado nas estações reprodutivas não necessariamente está restrita às características de genômica a serem implementadas na propriedade, mas também deve estar atenta à qualidade espermática. Objetivou-se com este estudo sistemático realizar levantamento bibliográfico quanto às ferramentas capazes de verificar, de forma subjetiva e computadorizada, características morfológicas e funcionais da célula espermática que possam prever a probabilidade do índice de fertilidade de reprodutores a campo.

Ao final de longos estudos definiu-se, através de testes e procedimentos laboratoriais complexos, 21 características seminais capazes de prever a fertilidade de um reprodutor. São elas: motilidade total, motilidade progressiva, velocidade de trajeto, frequência de batimentos, células com velocidade rápida, motilidade total após duas horas, motilidade progressiva após duas horas, velocidade de trajeto após duas horas, frequência de batimentos após duas horas, células com velocidade rápida após duas horas, células com membrana funcional após teste hipo-osmótico, espermatozoides com Membranas Plasmática e Acrossomal Intactas (AIMI), Espermatozoide com Membrana Plasmática Íntegra (Yo-Pro negativas) e alto grau de desorganização da bicamada lipídica (MIAD), Espermatozoides com membrana plasmática íntegra e elevada peroxidação lipídica (MIP), defeitos maiores, total de defeitos, razão largura:comprimento, Fourier 0, Fourier 2, heterogeneidade cromatínica e concentração espermática.

Palavras-chave: Características seminais. Sêmen. Touro. Testes laboratoriais.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------|---|
| AIMI | Espermatozoides apresentando membranas plasmática e acrossomal intactas |
| AIML | Espermatozoides apresentando membrana plasmática lesionada e membrana acrossomal intacta |
| ALMI | Espermatozoides apresentando membrana plasmática intacta e membrana acrossomal lesionada |
| ALML | Espermatozoides apresentando membranas plasmática e acrossomal lesionadas |
| ALH | Amplitude do deslocamento lateral da cabeça |
| ALH_2h | Deslocamento lateral da cabeça avaliada após 2 horas de incubação |
| BCF | Frequência de batimentos flagelar |
| BCF_2h | Frequência de batimentos avaliada após 2 horas de incubação |
| C11-BODIPY581/591 | Sonda fluorescente 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil) -4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3 ácido undecanóico |
| CASA | Análise computadorizada do semên (“Computer-Assisted Semen Analysis”) |
| CBRA | Colégio Brasileiro de Reprodução Animal |
| CV | Coeficiente de variação da intensidade de tons de cinza de cada cabeça espermática, o qual representa a heterogeneidade cromatínica |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| FITC-PSA | Isotiocianato de fluoresceína conjugado com aglutinina de <i>Pisum Sativum</i> |
| FIV | Fecundação <i>in vitro</i> |
| H342 | Corante fluorescente Hoechst 33342 |
| HOST | Teste Hiposmótico (Hypoosmotic Swelling Test) |
| IA | Inseminação Artificial |
| IATF | Inseminação artificial em tempo fixo |
| LIN | Linearidade |
| LIN_2h | Linearidade avaliada após 2 horas de incubação |
| M540 | Sonda fluorescente merocianina 540 |
| MIAD | Espermatozoide com membrana plasmática íntegra e alto grau de desorganização da bicamada lipídica. |
| MIBD | Espermatozoide com membrana plasmática íntegra e baixo grau de |

desorganização da bicamada lipídica;

| | |
|-----------------|---|
| MINP | Espermatozoides com membrana plasmática íntegra e reduzida peroxidação lipídica |
| MIP | Espermatozoides com membrana plasmática íntegra e elevada peroxidação lipídica |
| MP_2h | Motilidade progressiva avaliada após 2 horas de incubação |
| MPI | Células com Membrana Plasmática Intacta |
| MPL | Espermatozoide com membrana plasmática lesionada (Yo-Pro-1 positiva) |
| MT | Motilidade total |
| MT_2h | Motilidade total avaliada após 2 horas de incubação |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato |
| PI | Iodeto de Propídio |
| PIV | Produção <i>in vitro</i> |
| PM | Motilidade progressiva |
| RAPID | Porcentagem de células rápidas na amostra |
| RAPID_2h | Células rápidas na amostra avaliada após 2 horas de incubação |
| STR | Retilinearidade |
| STR_2h | Retilinearidade avaliada após 2 horas de incubação |
| TALP | “Tyrode’s Albumin Lactate Pyruvate” |
| TALPm | Meio TALP modificado |
| TTR | Teste de Termo-resistência espermática |
| VAP | Velocidade sobre um trajeto uniforme |
| VAP_2h | Velocidade uniforme avaliada após 2 horas de incubação |
| VCL | Velocidade curvilínea |
| VCL_2h | Velocidade curvilínea avaliada após 2 horas de incubação |
| VSL | Velocidade retilínea progressiva |
| VSL_2h | Velocidade retilínea avaliada após 2 horas de incubação |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 OBJETIVO..... | 15 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA..... | 16 |
| 3.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM BOVINOS..... | 16 |
| 3.2 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO..... | 16 |
| 3.3 O SEMEN UTILIZADO NOS PROGRAMAS DE IATF..... | 17 |
| 3.4 CORRELAÇÃO DAS ANÁLISES LABORATORIAIS DO SEMEN COM A FERTILIDADE A CAMPO..... | 18 |
| 3.5 ANÁLISES LABORATORIAIS DO SEMEN BOVINO..... | 18 |
| 3.5.1 Teste hipo-osmótico “host”..... | 19 |
| 3.5.2 Teste de termo resistência “tr”..... | 19 |
| 3.5.3 Análise computadorizada do movimento espermático “casa”..... | 20 |
| 3.5.4 Análise espermática por citometria de fluxo..... | 21 |
| 3.5.5 Análise computadorizada da morfometria e estrutura cromatinica..... | 22 |
| 3.6 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS <i>IN VITRO</i> NA PREDIÇÃO DA FERTILIDADE A CAMPO APÓS UM PROGRAMA DE IATF BOVINO..... | 23 |
| 3.6.1 Introdução..... | 23 |
| 3.6.2 Variáveis espermáticas como importantes preditores da taxa de concepção..... | 24 |

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 31

REFERENCIAS..... 32

1 INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira tem passado por processos de incorporação de novas tecnologias, afim de melhorar os índices zootécnicos dos rebanhos, e conseqüentemente, maiores lucros ao produtor. Dentre essas tecnologias, considera-se a inseminação artificial (IA) como a de maior importância, pois implica num maior aproveitamento de animais geneticamente superiores (SUGULLE *et al.*, 2006). Desde o início da implementação de técnicas de inseminação artificial, tem-se preocupado muito com a qualidade reprodutiva das fêmeas utilizadas, e ao passar dos anos, melhorias no campo da nutrição, do manejo sanitário, e no desenvolvimento de protocolos hormonais tem melhorado os índices zootécnicos na fase de cria, tal como taxa de concepção e taxa de prenhez, por exemplo. Entretanto, este é apenas um lado da moeda. Fatores ligados à qualidade seminal dos reprodutores utilizados nos serviços de reprodução bovina têm sido pouco estudados, e os poucos estudos que tem, juntamente com o senso comum da prática a campo tem mostrado que o efeito touro é um parâmetro de grande importância para o setor de cria, reduzindo gastos e aumentando os lucros do produtor (ZUCCOLARO, 2012). Devido os grandes rebanhos do Brasil, tornou-se imprescindível que grandes números de vacas sejam inseminados num curto período de tempo, levando a prática de descongelamento de várias palhetas de sêmen de uma só vez. Porém, enquanto uma vaca é inseminada, diversas palhetas ficam no descongelador extrapolando o tempo máximo de descongelamento, fazendo com que o banho-maria atue como ambiente de incubação para o sêmen, influenciando negativamente nas características seminais *in vitro*, e conseqüentemente na fertilidade e viabilidade do espermatozoide (ZUCCOLARO, 2012).

2 OBJETIVO

Objetivou-se com este trabalho revisar os métodos de estudo da qualidade seminal de touros reprodutores, além de apontar algumas características seminais que predizem uma melhor taxa de fertilidade do reprodutor.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM BOVINOS

A IA foi a primeira importante ferramenta reprodutiva aplicada em benefício do melhoramento genético de animais de produção (FOOTE, 2002). Em bovinos, sua utilização em larga escala se concretizou com a viabilização da criopreservação espermática após a descoberta de substâncias com propriedades crioprotetoras (GAO *et al.*, 1997). Atualmente, a IA figura como a biotécnica da reprodução mais utilizada em todo o mundo (PARKINSON, 2004), no entanto, no Brasil, estima-se que aproximadamente apenas 10% das fêmeas em idade reprodutiva são inseminadas (ASBIA, 2011). Dentre os fatores que podem ser apontados como as principais causas para o baixo percentual da utilização da IA no manejo reprodutivo de bovinos, podem ser destacados a carência de mão de obra qualificada e algumas deficiências básicas na infraestrutura das propriedades (BARROS; ERENO, 2004). Ainda, os principais empecilhos para a implementação dos programas de IA em países de clima tropical estão relacionados com a baixa taxa de detecção do estro, situação comum em rebanhos compostos predominantemente por animais *Bos indicus*, que podem não demonstrar sinais evidentes de estro (GALINA *et al.*, 1996). Assim, a adoção da biotécnica da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que por meio da utilização de hormônios induz a sincronização do estro e da ovulação, auxilia efetivamente a aplicabilidade da IA permitindo sua massificação. O emprego desta ferramenta de manejo suprime a necessidade de observação de estro e permite que um grande número de animais seja inseminado no mesmo dia (PURSLEY *et al.*, 1995; THATCHER *et al.*, 1996; BÓ *et al.*, 2003; BARUSELLI *et al.*, 2004).

3.2 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

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

1998; CHEBEL *et al.*, 2006; GALVÃO *et al.*, 2007; MENEGHETTI *et al.*, 2009; BISINOTO *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2011). Assim, a possibilidade da realização da inseminação em tempo pré-determinado, e sem a necessidade de observação de estro, fez com que os programas de IATF representassem a forma mais prática para o aumento da utilização da IA na pecuária atual (SÁ FILHO *et al.*, 2010). Além de representar uma importante ferramenta de gestão dos rebanhos bovinos por aumentar a taxa de serviço das propriedades, a IATF também pode diminuir o impacto negativo do anestro pós-parto por induzir a ovulação e/ou a ciclicidade dos animais em anestro. Esses fatores são determinantes para maior ganho econômico e genético (MADUREIRA e PIMENTEL, 2005; CRESPILO, 2010). Entretanto, embora os fatores relativos à fêmea que influenciam o sucesso da IATF têm sido abrangentemente estudados, os fatores relacionados com a qualidade do sêmen utilizado não têm recebido a mesma atenção. Assim, julga-se necessário ressaltar que a qualidade das amostras seminais pode influenciar efetivamente o sucesso destes programas reprodutivos (CRESPILO, 2010).

3.3 O SÊMEN UTILIZADO NOS PROGRAMAS DE IATF

De acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) os valores de referência para a montagem das palhetas de sêmen são de 30% de espermatozoides com motilidade progressiva, vigor 3 (escala de 0 a 5), 70% de células morfológicamente normais, além de concentração espermática a partir de 10 milhões de células para doses de sêmen convencional. Embora esses parâmetros estejam em constante análise e observação pela rotina laboratorial, atualizações ainda devem ser feitas, principalmente por análise computadorizada do movimento espermático e uso de sondas fluorescentes para estudo morfofuncional e bioquímico da célula espermática.

A crescente expansão do mercado agropecuário e da inseminação artificial impulsionaram a produção de sêmen bovino no país. Embora as Centrais de Coleta e Congelação de Sêmen tenham acompanhado a expansão do mercado, investindo consideravelmente na contratação e capacitação de mão de obra, em infraestrutura, parque de equipamentos e revisão de processos, muitos são os desafios envolvidos na produção de doses de sêmen com qualidade, como os diversos processos patológicos que podem acometer os touros em coleta, a idade e habilidade física dos

reprodutores, além de fatores relacionados ao estresse e ambiência (CRESPILHO, 2021).

O sêmen após colhido pode ser dividido em convencional ou sexado. O sêmen sexado, embora mais oneroso, tem a vantagem de, como por exemplo, produzir apenas animais do sexo feminino, o que é de grande interesse na pecuária leiteira. A citometria de fluxo ainda é a técnica que permite a comercialização das doses sexadas, devido aos 90% de acuidade já comprovada (SHARPE; EVANS, 2009). No entanto, tem-se obtido avanços nas novas técnicas de sexagem, como utilização de anticorpos específicos (MATTA, 2003), uso de nanopartículas magnéticas (DOMINGUEZ *et al.*, 2018), e a técnica de SexedUltra™ (GONZÁLEZ-MARÍN *et al.*, 2018) dentre outras; que, têm por objetivo serem alternativas mais práticas e com menos efeitos deletérios ao sêmen.

O método de criopreservação do sêmen bovino tem relevante importância, pois é através desse método que se realiza a disseminação genética de reprodutores conceituados, melhorando geneticamente o rebanho. O sêmen quando criopreservado recebe a adição de diluentes que são responsáveis pela manutenção da osmolaridade e tamponamento do meio. Além do diluente, adiciona-se crioprotetores a fim de aumentar a proteção e reduzir as perdas relacionadas à células espermáticas. Antioxidantes, proteínas anticoagulantes, inibidores da capacitação espermática prematura são colocados no sêmen para minimizar as perdas, melhorando os índices de concepção dos rebanhos. Além do diluente, adiciona-se ainda crioprotetores (leite, gema de ovo e açúcar são os principais), a fim de aumentar a longevidade do sêmen congelado. Antioxidantes, inibidores da capacitação espermática prematura e proteínas anticoagulantes são aditivos que melhoram a qualidade seminal no processo de congelamento (LEITE *et al.*, 2011).

Julga-se necessário alertar para a atual prática rotineira do descongelamento simultâneo de diversas palhetas de sêmen no momento da IA. Isso porque, o manejo do sêmen congelado (e/ou de seu ambiente de descongelamento) também deve ser considerado como possível fator de influência na qualidade das amostras seminais (DEJARNETTE *et al.*, 2002). A Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA) e o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) recomendam, para IA de bovinos, o procedimento de descongelamento de uma única palheta de sêmen em banho-maria, com temperatura entre 35 a 37°C, durante 30 segundos (para palhetas de 0,5 ml). Todavia, sob estas condições, algumas palhetas permanecem no

banho-maria enquanto as outras inseminações são realizadas. Neste caso, o ambiente aquecido do banho-maria poderia servir como um ambiente de incubação para o sêmen, o que poderia influenciar a viabilidade e, portanto, a fertilidade do espermatozoide (BROWN *et al.*, 1991).

3.4 CORRELAÇÃO DAS ANÁLISES LABORATORIAIS DO SÊMEN COM A FERTILIDADE A CAMPO

Entre as características espermáticas mais analisadas laboratorialmente, destacam-se motilidade progressiva (KJAESTAD *et al.*, 1993; FARREL *et al.*, 1998; VERSTEGEN *et al.*, 2002), morfologia (BARTH, 1992; SAACKE, 1998) e integridade de membranas (CORREA *et al.*, 1997; BRITO *et al.*, 2003; JANUSKAUSKAS *et al.*, 2003; TARTAGLIONE; RITTA, 2004). Assim sendo, até o atual momento, nenhum teste laboratorial foi capaz de predizer, com devida repetitividade, a real fertilidade de um reprodutor (ARRUDA *et al.*, 2007; SUDANO *et al.*, 2011). Deste modo, ainda hoje, o método mais eficaz e acurado de se estimar a fertilidade de um touro é por meio de testes de fertilidade a campo (ZHANG *et al.*, 1999), que além de trabalhosos e demorados, são muito onerosos (LARSSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000). Embora correlações positivas entre a PIV e a fertilidade *in vivo* terem sido relatadas por diversos autores (MARQUANT-LE GUIENNE *et al.*, 1990; SHAMSUDDIN & LARSSON, 1993; LONERGAN, 1994; ZHANG *et al.* 1997; LARSSON & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000; WARD *et al.*, 2001), outros estudos não confirmaram a ocorrência de alta correlação entre os resultados de fertilidade *in vitro* e *in vivo* dos reprodutores testados.

3.5 ANÁLISES LABORATORIAIS DO SÊMEN BOVINO

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

sêmen congelado parecem apresentar valor limitado para o estudo da qualidade seminal sobre as taxas de fertilidade a campo. Assim, acredita-se que a utilização de técnicas mais modernas e precisas permita uma melhor e mais detalhada avaliação do sêmen bovino (ARRUDA *et al.*, 2007). O método clássico de acessar a viabilidade dos espermatozoides é determinado pela: estimativa da porcentagem de células com motilidade progressiva utilizando a microscopia óptica, sendo essa superior a 70%; vigor espermático acima de 3 (escala de 0 a 5); concentração espermática; e avaliação morfológica, dividida em defeitos maiores e menores, inferior a 30% (CBRA, 1998).

3.5.1 TESTE HIPO-OSMÓTICO “HOST”

O teste hipo-osmótico “HOST” é um método simples e muito utilizado para avaliar a integridade funcional da membrana das células espermáticas (REVELL; MRODE, 1994; CORREA *et al.*, 1997; SIQUEIRA *et al.*, 2007). Uma das propriedades da membrana celular é o transporte seletivo de moléculas que pode ser observado quando a célula é exposta a condições hipo-osmóticas. Nesta situação, a água entra para o meio intracelular até que o equilíbrio osmótico tenha sido estabelecido. Entretanto, esse processo ocorre somente nas células que possuem a membrana plasmática íntegra e viável. Logo, o influxo de água causa edema celular nos espermatozoides viáveis, fenômeno que pode ser visualizado pela observação do enrolamento na região da cauda, local de maior susceptibilidade (JEYENDRAN *et al.*, 1984). Para se determinar a porcentagem de células apresentando membrana plasmática viável neste teste (células positivas para HOST), realiza-se o cálculo da porcentagem de espermatozoides apresentando alterações na região da cauda após teste hipo-osmótico, subtraindo-se deste valor, a porcentagem de alterações na região da cauda dos espermatozoides antes do teste hipo-osmótico (REVELL; MRODE, 1994).

3.5.2 TESTE DE TERMO-RESISTENCIA “TTR”

O Teste de Termo-resistência (TTR) consiste basicamente na incubação de uma amostra de sêmen descongelado, em banho-maria, por tempo pré-estabelecido, sob determinada temperatura, avaliando-se a motilidade

progressiva em diferentes momentos pós-incubação (DIMITROPOULOS, 1967). De acordo com o CBRA (1998), denomina-se “Teste de Termo-resistência Lento” a prova que consiste na incubação de uma amostra de sêmen em banho-maria, à 38°C, durante 5 horas, avaliando-se a percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva ao final do teste. Por outro lado, o “Teste de Termo-resistência Rápido” é a prova que consiste na incubação da amostra de sêmen em banho-maria, à 46°C, durante 30 minutos. O CBRA (1998) considera de boa qualidade a amostra que apresentar pelo menos 15% de espermatozoides com motilidade progressiva ao final do TTR lento ou rápido. Recentemente VIANNA et al. (2009), concluíram que o TTR rápido e lento não mimetiza as condições uterinas e a sobrevivência dos espermatozoides no trato genital da vaca, e não deve ser utilizado para predizer a fertilidade das amostras de sêmen. Segundo os autores, existe grande influência das várias substâncias presentes no trato genital da vaca, que possuem papel fundamental no metabolismo e na sobrevivência dos espermatozoides até o momento da fertilização.

3.5.3 ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO “CASA”

O sistema CASA refere-se a um sistema automatizado (“hardware e software”) que visualiza e digitaliza imagens sucessivas dos Espermatozoides móveis. Estas são posteriormente identificadas e analisadas e, desta forma, a trajetória espermática é estabelecida. Os resultados desses processamentos são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozoide. Portanto, apesar do seu alto custo, o sistema CASA possibilita melhor detalhamento da qualidade do sêmen analisado, fornecendo informações rápidas e precisas, bem como detalhes adicionais sobre diversas características do movimento dos Espermatozoides na amostra (FARREL *et al.*, 1998). De maneira geral, as variáveis da cinética espermática avaliadas pelo sistema CASA são (ARRUDA, 2000): a) Motilidade total (MT): razão das células móveis no total de Espermatozoides da amostra (%); b) Motilidade progressiva (PM): razão das células móveis com movimento progressivo no total de Espermatozoides da amostra (%); c) Velocidade de

trajeto (VAP): indica a velocidade média ininterrupta do caminho da célula (m/s); d) Velocidade progressiva (VSL): indica a velocidade média percorrida em linha reta entre o início e o final do percurso (m/s); e) Velocidade curvilínea (VCL): indica a velocidade média de cada ponto atual do trajeto seguido por cada célula (m/s); f) Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH): corresponde à largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento (m); g) Frequência de batimento (BCF): definida como a frequência com que a cabeça do espermatozoide move-se durante o trajeto percorrido (Hz); h) Retilinearidade (STR): indica o afastamento da trajetória da célula espermática considerando-se uma linha reta (%); i) Linearidade (LIN): indica o afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta (%); j) Células rápidas (RAPID): indica a porcentagem de células rápidas na amostra (%).

3.5.4 ANÁLISE ESPERMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Avanços recentes na tecnologia de coloração têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozoides (ARRUDA *et al.*, 2007). Dessa forma, a funcionalidade ou integridade das estruturas espermáticas é monitorada por sondas fluorescentes (ou fluorocromos), as quais possuem a capacidade de se ligar e marcar estruturas específicas das células, permitindo um diagnóstico mais fácil e direto, dependendo de suas características físicas (ARRUDA *et al.*, 2011). Embora avaliações por meio da citometria de fluxo apresentem a principal limitação do alto custo do equipamento, ressalta-se que na microscopia de fluorescência, apesar de menos dispendiosa, geralmente a quantidade de células analisadas não excede o número de 500 por amostra. Portanto, apesar de onerosa, a citometria de fluxo surge como uma técnica vantajosa para avaliação espermática, uma vez que o sistema automatizado tem a capacidade de examinar aproximadamente 30.000 células por minuto, permitindo, dessa forma, resultados mais acurados e fidedignos em curto período (LEITE *et al.*, 2010; ARRUDA *et al.*, 2011; De ANDRADE *et al.*, 2011). Ressalta-se ainda, que a combinação de vários corantes possibilita a avaliação de diversas estruturas celulares simultaneamente (CELEGHINI *et al.*, 2007). Assim, com o uso das

sondas fluorescentes, várias características espermáticas podem ser avaliadas como a integridade de membranas plasmática e acrossomal, o potencial mitocondrial, a translocação de fosfolipídios de membrana, a peroxidação lipídica, entre outras (ARRUDA *et al.*, 2011).

3.5.5 ANÁLISE COMPUTADORIZADA DA MORFOMETRIA E ESTRUTURA CROMATINICA

Um dos métodos empregado para avaliação da cromatina foi desenvolvido por MELLO (1982), o qual emprega um corante catiônico metacromático denominado Azul de Toluidina. Esta substância cora seletivamente os grupos ácidos de componentes teciduais, apresentando alta afinidade pelo DNA das células que se coram profundamente (MELLO, 1982). Para a caracterização de espermatozoides corados com Azul de Toluidina, a utilização de análises de imagem computadorizada garante menor subjetividade nas avaliações e permite que a análise morfométrica seja realizada concomitantemente com a avaliação da cromatina (BELETTI *et al.*, 2004). Nesta técnica, após a coloração do esfregaço, imagens digitais de pelo menos 100 espermatozoides são obtidas para cada amostra, por meio de microscópio óptico acoplado a uma câmera digital, e conectado a um microcomputador. As imagens são capturadas digitalmente em tons de cinza (BELETTI; COSTA, 2003). Posteriormente, as imagens dos espermatozoides são avaliadas por algoritmos desenvolvidos em ambiente de programação matemática (ambiente SCILAB; SIP toolbox: "*Scilab Image Processing toolbox*"), pela quantificação dos pixels de cada imagem. As seis cabeças espermáticas com menor valor de pixel são consideradas o padrão da amostra. Essas células que são as menos coradas são, teoricamente, as células com cromatina mais compactada (BELETTI *et al.*, 2005a; 2005b). Ainda nesta técnica, a área, o perímetro, a largura, o comprimento, a relação comprimento: largura, a elipsidade e o fator forma de todas as cabeças são também determinados por cálculos matemáticos, realizados com algoritmos desenvolvidos em ambiente SCILAB.

3.6 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS *IN VITRO* NA PREDIÇÃO DA FERTILIDADE A CAMPO APÓS UM PROGRAMA DE IATF BOVINO.

Muitos métodos clássicos e modernos têm sido utilizados para avaliação laboratorial da qualidade espermática de touros após criopreservação (REVELL; MRODE, 1994; VERSTEGEN *et al.*, 2002; BROUWERS; GADELLA, 2003; BELETTI *et al.*, 2005; CHELEGHINI *et al.*, 2007; KASIMANICKAM *et al.*, 2007). Entretanto, tais resultados nem sempre se correlacionam com a real fertilidade da amostra seminal (ZHANG *et al.*, 1999; SUDANO *et al.*, 2011). As relações da qualidade seminal *in vitro* com a fertilidade a campo tem sido o tema de vários estudos (AMANN, 1989; FARRELL *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 1999; LARSSON & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000; RODRIGUEZMARTINEZ, 2003; SUDANO *et al.*, 2011) porém, até o atual momento, a forma mais eficiente para estimar a fertilidade individual de um touro é através dos testes de fertilidade a campo, que são onerosos e demorados (ZHANG *et al.*, 1999; LARSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000). Mesmo sendo evidente que a identificação de um método prático de análise seminal *in vitro*, que fosse capaz de determinar a fertilidade do touro e substituísse por completo a necessidade de experimentos a campo, seria de grande benefício para os programas de IA (WARD *et al.*, 2001), é improvável que a avaliação de uma única característica espermática possa refletir a real capacidade fecundante da amostra seminal (ARRUDA *et al.*, 2007). Portanto, encontrar um grupo de características espermáticas consideradas importantes em predizer a taxa de concepção seria um método útil para monitorar e/ou predizer a fertilidade do touro.

3.6.1 VARIÁVEIS ESPERMÁTICAS CONSIDERADAS IMPORTANTES PREDITORES DA TAXA DE CONCEPÇÃO

A avaliação computadorizada do movimento espermático exhibe parâmetros relacionados a cinética e anatomia espermática, são elas: Motilidade Total (MT; %), Motilidade Progressiva (PM; %), Velocidade de Trajeto (VAP; m/s), Velocidade Progressiva (VSL; m/s), Velocidade Curvilinear (VCL; m/s), Amplitude Lateral da Cabeça (ALH; m), Frequência de Batimentos

(BCF; Hz); Retilinearidade (STR; %), Linearidade (LIN; %) e Células com Velocidade Rápida (RAPID; %) (ZOCCOLARO, 2012).

O teste de termo resistência verifica a longevidade do sêmen após duas horas de descongelamento da palheta e os parâmetros aqui mostrados são os mesmos citados anteriormente: TM_2h, PM_2h, VAP_2h, VSL_2h, VCL_2h, ALH_2h, BCF_2h, STR_2h, LIN_2h, RAPID_2h (ZOCCOLARO, 2012).

O teste hipo-osmótico tem a finalidade de avaliar a membrana celular da célula, e ao final dele, porcentagem de células viáveis é calculada e classificada em células "HOST +" (ZOCCOLARO, 2012).

A citometria de fluxo analisa a integridade da membrana plasmática e acrossomal, peroxidação lipídica e organização da bicamada lipídica, e ao final deste procedimento, é detectado vários conjuntos de células: AIMI = Espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas; AIML = Espermatozoides com membrana plasmática lesionada e membrana acrossomal intacta; ALMI = Espermatozoides com membrana plasmática intacta e membrana acrossomal lesionada; ALML = Espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal lesionadas (ZOCCOLARO, 2012).

Para a avaliação da estabilidade da membrana plasmática, utiliza-se também, a citometria de fluxo, porem com a adição de uma sonda fluorescente (Yo-Pro/M540), e ao final, obtém-se 3 categorias de células: células Yo-Pro positivas = espermatozoide com membrana plasmática lesionada (Yo-Pro+); MIBD = espermatozoide com membrana plasmática íntegra (Yo-Pro negativas) e baixo grau de desorganização da bicamada lipídica; MIAD = espermatozoide com membrana plasmática íntegra (Yo-Pro negativas) e alto grau de desorganização da bicamada lipídica (ZOCCOLARO, 2012).

A citometria de fluxo também diz respeito à peroxidação lipídica da membrana do espermatozoide e após todos os processos relacionados ao seu estudo, surge uma categoria de 4 tipos de células: MINP = Espermatozoides com membrana plasmática íntegra e reduzida peroxidação lipídica; MIP = Espermatozoides com membrana plasmática íntegra e elevada peroxidação lipídica; MLNP = Espermatozoides com membrana plasmática lesionada e reduzida peroxidação lipídica; MLP = Espermatozoides com membrana plasmática lesionada e elevada peroxidação lipídica (ZOCCOLARO, 2012).

A avaliação da morfologia espermática é feita por microscopia em lente de aumento de 1000X e suas características são classificadas em defeitos maiores e menores (ZOCOLARO, 2012).

Para a avaliação de cromatina e morfometria, realiza-se dois esfregaços para serem observados em microscopia com lente de 1000x, e ao final do procedimento as seguintes características são detectadas: área, perímetro, largura, comprimento, razão largura:comprimento, elipticidade, fator forma de todas as cabeças espermáticas, Fourier 0 ao 2, simetria lateral e simetria antero-posterior da cabeça espermática. Para mensuração da concentração espermática, realiza-se a contagem de espermatozoides por microscopia óptica com lente de aumento de 400x em câmara de Neubauer (ZOCOLARO, 2012).

Nem todos os parâmetros expostos anteriormente realmente predizem a qualidade seminal de um reprodutor. Para tal, é necessário utilizar o modelo de regressão matemático denominado Mínimos Quadrados Parciais (do inglês "Partial Least Squares" PLS). Tal método, consiste em uma técnica de análise de dados multivariados utilizada para relacionar uma (ou mais) variável resposta (taxa de concepção, neste caso) com diversas variáveis independentes (características espermáticas *in vitro*), baseadas no uso de fatores (ZUCOLARO, 2012). É indicado a realização de várias vezes a análise PLS, excluindo os parâmetros com variável para projeção estatística (VIP) inferiores a 0,8 até que nenhuma variável restante apresente $VIP < 0,8$ (ZUCOLARO, 2012). Após esse processo, juntamente com os conhecimentos científicos publicados até então, é possível eleger uma classe com 21 variáveis que predizem a qualidade seminal de determinado reprodutor. São elas: Motilidade total (TM), Motilidade Progressiva (PM), Velocidade de Trajeto (VAP), Frequência de Batimentos (BCF), Células com Velocidade Rápida (RAP), Motilidade Total após duas horas (TM_2h), Motilidade Progressiva após duas horas (PM_2h), Velocidade de Trajeto após duas horas (VAP_2h), Frequência de batimentos após duas horas (BCF_2h), Células com Velocidade Rápida após duas horas (RAP_2h), Células com Membrana Funcional após Teste Hipo-osmótico (HOST+), Espermatozoides com Membranas Plasmática e Acrossomal Intactas (AIMI), Espermatozoide com Membrana Plasmática Íntegra (Yo-Pro negativas) e alto grau de desorganização da bicamada lipídica

(MIAD), Espermatozoides com membrana plasmática íntegra e elevada peroxidação lipídica (MIP), defeitos maiores, total de defeitos, razão largura:comprimento, Fourier 0, Fourier 2, heterogeneidade cromatínica e concentração espermática (ZOCCOLARO, 2012).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É notável que no Brasil os estudos da fisiologia do sistema reprodutor da fêmea e os sistemas ligados, diretamente ou indiretamente, a ele são mais intensos. Porém, nada adianta ter um folículo dominante bem desenvolvido, juntamente com um oócito saudável sem ter um espermatozoide totalmente viável para a fertilização.

Os estudos, tanto in vivo quanto in vitro, do gameta masculino de um reprodutor bovino ainda é escasso no Brasil. Além de serem onerosos, é grande a quantidade de touros com sêmen disponível no mercado para a serem testados.

Diante de alguns estudos feitos com modernos equipamentos e exames laboratoriais, foram selecionados, por métodos matemáticos, 21 variáveis capazes de predizerem a fertilidade de um touro. São elas: TM, PM, VAP, BCF, RAP, TM_2h, PM_2h, VAP_2h, BCF_2h, RAP_2h, HOST+, AIMI, MIAD, MIP, defeitos maiores, total de defeitos, razão largura:comprimento, Fourier 0, Fourier 2, heterogeneidade cromatínica e concentração espermática.

A cada ano que passa o uso de tecnologias da reprodução vem aumento no país. Para se ter uma taxa de concepção alta em um rebanho, precisa-se, necessariamente, de uma fêmea com um oócito bem desenvolvido e um macho com um espermatozoide saudável. É sabido que a vaca recebe mais atenção, deixando erroneamente o macho em segundo plano. Portanto é necessário mais profissionais na área de espermograma, afim de solucionar os problemas inerentes a baixa fertilidade dos reprodutores.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **J. Androl.**, v.10, p.89-98, 1989.
- ARRUDA, R.P. **Avaliação do sêmen congelado de bovinos. Provas lentas e rápida de termo resistência: Efeito sobre a fertilidade.** 1988. 41f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.
- ARRUDA, R.P.; BARNABE, V.H.; ALENCAR, M.M. Teste de termo resistência rápido: uma opção para avaliar a fertilidade do sêmen congelado bovino. **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 12, Belo Horizonte, MG, 1997. Anais Belo Horizonte – MG, p.178-179, 1997.
- ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epiufluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA).** 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R.P.; DE ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.31, n.1, p.8-16, 2007.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.35, n.2, p.145-151, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. Relatório Anual, São Paulo, p.1-21, 2011.
- BARBOSA, R.T.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M.A.C.M. A importância do exame andrológico em bovinos. **EMBRAPA - Circular Técnica**, v.41, p.1-13, 2005.
- BARROS, C.M.; ERENO, R.L. Avanços em tratamentos hormonais para a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. **Acta Scientiae Vet. (Suplemento)**, v. 18, p.23-44, 2004.
- BARTH, A.D. The relationship between sperm abnormalities and fertility. In: **Proceedings of the 14th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction**, pp. 47–63, 1992.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CBRA (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal). 2013. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, 104p.

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

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

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

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

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

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

DOMÍNGUEZ, E.; MORENO-IRUSTA, A.; CASTEX, H.R.; BRAGULAT, A.F.; UGAZ, C.; CLEMENTE, H.; GIOJALAS, L.; LOSINNO, L. Sperm Sexing Mediated by Magnetic Nanoparticles in Donkeys, a Preliminary In Vitro Study. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.65, p.123-127, 2018.

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

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

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

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

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

LEITE, P.A.; SCHEREDER, G.G.; ALMEIDA, C.L.R.; ZUCARRI, C.E.S.N.; COSTA E SILVA, E.V. **Criopreservação do Sêmen Bovino**. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, Brasil.

GONZÁLEZ-MARÍN, C.; GÓNGORA, C. E., GILLIGAN, T. B., EVANS, K. M., MORENO, J. F., & VISHWANATH, R. In vitro sperm quality and DNA integrity of SexedULTRATM sexsorted sperm compared to non-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, v.114, n.1, p.40-45, 2018.

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

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

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

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

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

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

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

Oliveira, Leticia Zoccolaro. **Utilização de diferentes touros na IATF: características seminais e suas relações com as taxas de fertilidade a campo.** / Letícia Zoccolaro Oliveira. – – Jaboticabal, 2012.

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

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

MATTA, C.G.F. Desenvolvimento de uma metodologia para sexagem de espermatozoides de bovinos utilizando anticorpos monoclonais e complemento, 2003. 55p. (Tese de Doutorado em Produção Animal). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes/RJ, 2003.

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

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

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

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

PURSLEY, J.R.; SILCOX, R.W.; WILTBANK, M.C. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.2139–2144, 1998.

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

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

SÁ FILHO, M.F.; CRESPILO, A.M.; SANTOS, J.E.P.; PERRY, G.A.; BARUSELLI, P.S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos*

indicus cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v.120, p.23–30, 2010.

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

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

SHARPE, J.C.; EVANS, K.M. Advances in flow cytometry for sperm sexing. **Theriogenology**, v.71, n.1, p.4-10, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M.G.H.; RODRIGUEZMARTINEZ, H. Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozen-thawed sêmen from young dairy bulls entering an AI-programme. **Internat. J. Androl.**, v.22, p.253–260, 1999.