

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS APÓS DESAFIO
LABORATORIAL QUE MIMETIZA CONDIÇÕES UTERINAS E SUA
RELAÇÃO COM RESULTADOS DE FERTILIDADE A CAMPO**

JOSÉ ANDRÉS NIVIA RIVEROS

BELO HORIZONTE

2022

JOSÉ ANDRÉS NIVIA RIVEROS

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS APÓS DESAFIO
LABORATORIAL QUE MIMETIZA CONDIÇÕES UTERINAS E SUA RELA-
ÇÃO COM RESULTADOS DE FERTILIDADE A CAMPO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área: Reprodução Animal

Orientadora: Leticia Zoccolaro Oliveira

Belo Horizonte
2022

FICHA CATALOGRÁFICA

R621a Riveros, José Andrés Nivia, 1995-
Avaliação de características espermáticas após desafio laboratorial que mimetiza condições uterinas e sua relação com resultados de fertilidade a campo / José Andrés Nivia Riveros . - 2022
64f.: il.
Orientadora: Leticia Zoccolaro Oliveira
Coorientador: Marcelo Emilio Beletti
Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre.
Área de concentração: Reprodução animal.
Bibliografias: f. 53 a 63.

1. Bovino de leite - Teses - 2. Sêmen - Fertilidade - Teses - 3. Reprodução animal - Teses
I. Oliveira, Leticia Zoccolaro - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089 26

Bibliotecária responsável Cristiane Patricia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - JOSÉ ANDRÉS NIVIA RIVEROS

Às 13:00 horas do dia 18 de fevereiro de 2022, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

“AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS APÓS DESAFIO LABORATORIAL QUE MIMETIZA CONDIÇÕES UTERINAS E SUA RELAÇÃO COM RESULTADOS DE FERTILIDADE A CAMPO”

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Reprodução Animal**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Leticia Zoccolaro Oliveira**, após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof. (a) / Dr. (a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Leticia Zoccolaro Oliveira	X	
Andre Maciel Crespilho	X	
Manoel Francisco de Sá Filho	X	
Gabriel Augusto Monteiro	X	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado(a)	X	Reprovado(a)	
-------------	---	--------------	--

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar 01 volume encadernado da versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2022.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Zoccolaro Oliveira**, Professora do Magistério Superior, em 18/02/2022, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Augusto Monteiro**, Professor do Magistério Superior, em 27/02/2022, às 21:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Manoel Francisco de Sá Filho**, Usuário Externo, em 07/03/2022, às 05:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Maciel Crespilho**, Usuário Externo, em 07/03/2022, às 17:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1239940** e o código CRC **9D4868AA**.

Dedico

A mis padres Sonia Patricia Riveros y José Armando Nivia,

A mis hermanos María Camila y Mario Alejandro.

A mi familia y amigos

No solo mis logros, sino todo lo que soy.

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a todas a pessoas que fazem parte da minha vida, pessoas que me acompanharam e aconselharam. A mi familia por haberme dado el apoyo y la fortaleza para continuar creciendo. A mi padre José Armando y mi madre Sonia Patricia por haberme enseñado el valor de la humildad y por regalarme el carácter suficiente para cumplir mis metas a pesar de la distancia. A mis hermanos por la fuerza e incentivo durante este largo camino llamado vida. A mis abuelos, tios, primos y amigos que desde la distancia me apoyaron y acompañaron en cada paso. À minha mão direita nos experimentos e trabalhos, minha companheira da pós e namorada, quem fez tudo isto possível, Ana Carolina.

À minha orientadora, Profa. Leticia Zoccolaro Oliveira por ter me acolhido desde o início, pela oportunidade, os conselhos e o carinho durante estes últimos anos. Às minhas colegas da pós-graduação que fizeram tudo isso possível.

Aos professores, técnicos, mestres e pessoal que me acompanharam e ajudaram neste percorrido na Universidade Federal de Minas Gerais, ao Professor Marc Henry por ter me dado essa primeira oportunidade, por ter aberto a porta que me permitiria estar onde estou hoje.

Aos meus coorientadores Prof. Marcelo Emilio Beletti e Prof. José Carvalho, pela disposição, cordialidade e atenção durante nosso experimento.

Agradeço imensamente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio com a bolsa de estudos durante o período do mestrado.

São poucas as palavras, mas muita a gratidão com todas as pessoas que fizeram desta etapa uma realidade. Sou muito grato pelo carinho e apoio incondicional,

“No son los títulos los que honran a los hombres,
sino que los hombres honran sus títulos”

Nicolás Maquiavelo

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar diferenças na resistência *in vitro* de amostras de sêmen bovino descongelado, depois de serem submetidas a um desafio laboratorial que mimetiza condições do trato reprodutor das vacas, a fim de comparar as características seminais *in vitro* com a fertilidade *in vivo* dos diferentes touros avaliados. Foram utilizadas doses de sêmen de 6 touros, sendo avaliada uma partida de cada touro e três repetições por partida ($n = 18$). Para cada partida de sêmen, o seguinte procedimento foi realizado: inicialmente, a dose de sêmen (500 μL) foi descongelada à 37°C por 30 seg (Grupo Controle) e foram avaliados: motilidade, vigor, concentração, morfologia espermática, funcionalidade da membrana plasmática (teste hiposmótico; HOST), análise computadorizada da cinética espermática (CASA) e análise da integridade de cromatina e morfometria espermática pelo teste de azul de toluidina. Em seguida, uma alíquota de 200 μL da amostra descongelada foi submetida ao teste de resistência seminal *in vitro* aqui proposto (chamado de desafio laboratorial). A alíquota de 200 μL foi depositada em gradiente descontínuo de Percoll (250 μL de Percoll 45% + 250 μL de Percoll 90%) e centrifugada a 410x g, por 10 min. Após centrifugação, removeu-se o sobrenadante e, no pellet formado, ajustou-se a concentração em meio TALP (5×10^6 spz/mL) e adicionou-se heparina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Essa amostra foi então incubada a 38,5°C, por 2h, em estufa com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂. Ao final do presente desafio laboratorial, as mesmas análises seminais descritas para o grupo controle foram realizadas (Grupo Desafio). Por fim, as características seminais *in vitro* foram comparados com os resultados de fertilidade *in vivo* destas partidas de sêmen. Os dados de campo foram analisados por Regressão logística. Os resultados laboratoriais foram analisados por ANOVA e a comparação de médias. Em todos os testes foi considerado 5% de significância pelo software R. A taxa de concepção (TC) total dos seis touros foi 49% ($n = 890$ vacas). O efeito do touro foi o fator mais importante ($P = 0,007$) no modelo geral da TC das vacas aos 30 dias após inseminação. Não foi observado efeito do ECC ($P = 0,459$), inseminador ($P = 0,562$) ou lote de fêmeas ($P = 0,398$), nem das interações ($P > 0,05$). Detectou-se maior ($P < 0,05$) fertilidade a campo do touro 6 em comparação aos touros 1 e 2. Com relação aos parâmetros seminais após a descongelação, foi observada maior ($P = 0,0051$) integridade de membrana (HOST) no touro 1 do que no touro 6. Adicionalmente, o touro 1 apresentou maior ($P = 0,0001$) fator de forma, menor ($P = 0,0025$) simetria antero-posterior e maior ($P = 0,0141$) Fourier 1 do que o touro 6. Na avaliação após o desafio, foram observadas maior motilidade visual ($P = 0,0002$) e vigor ($P = 0,0005$), no touro 6 do que no touro 1. Após o desafio, com relação as características morfométricas dos espermatozoides, apenas no fator forma as diferenças entre os touros 1 e 6 se mantiveram presentes, inferindo ser esta característica intrínseca ao touro 1. Na integridade do DNA, não foram observadas diferenças entre os touros estudados, antes ou após o desafio. Conclui-se que o desafio laboratorial aqui proposto permitiu identificar diferenças na resistência *in vitro* de amostras seminais de diferentes touros, considerando os parâmetros motilidade visual e vigor, funcionalidade da membrana plasmática e motilidades total e progressiva do CASA. Entretanto, maiores estudos se fazem necessários para confirmar a real capacidade do presente desafio laboratorial de identificar touros de maior e/ou menor taxa de concepção.

Palavras-chave: Fertilidade, efeito touro, desafios laboratoriais, características espermáticas.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate *in vitro* resistance of frozen-thawed bovine semen after being submitted to a laboratory challenge that mimics conditions of the cow's reproductive tract, and to compare *in vitro* semen characteristics with *in vivo* fertility of the bulls evaluated. Semen doses from 6 bulls were used, with one batch of each bull and three replications per batch being evaluated (n = 18). For each semen batch, the following procedure was performed: initially, the dose of semen (500 μ L) was thawed at 37°C for 30 seconds (Control Group) and the following parameters were evaluated: motility, vigor, concentration, sperm morphology, plasma membrane functionality (hyposmotic test; HOST), computerized analysis of sperm kinetics (CASA) and analysis of chromatin integrity and sperm morphometry by the toluidine blue stain. Then, an aliquot of 200 μ L of the thawed sample was submitted to the *in vitro* seminal resistance test proposed here (called laboratory challenge). The 200 μ L aliquot was deposited on a discontinuous Percoll gradient (250 μ L 45% Percoll + 250 μ L 90% Percoll) and centrifuged at 410x g for 10 min. After centrifugation, the supernatant was removed and, in the pellet formed, concentration was adjusted in TALP medium (5x10⁶ sperm/ml) and heparin (5 μ g/ml) was added. This sample was then incubated at 38.5°C for 2h at controlled atmosphere with 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂. At the end of the laboratory challenge, the same semen analyzes described for the control group were performed (Challenge Group). Finally, the *in vitro* semen characteristics were compared with the *in vivo* fertility results of these semen batches. Field data were analyzed by logistic regression. The laboratory results were analyzed by ANOVA. For all tests, a level of 5% significance was considered by the R software. The total conception rate (CR) for the six bulls was 49% (n= 890 cows). The bull effect was the most important factor (P = 0.007) in the overall model of CR at 30 days after insemination. No effect on CR was observed for Body Condition Score (P = 0.459), AI Technician (P = 0.562) or female lot (P = 0.398), nor their interactions (P > 0.05). Higher (P < 0.05) field fertility was detected in bull 6 compared to bulls 1 and 2. Regarding to the semen parameters after thawing, greater (P = 0.0051) membrane integrity (HOST) was observed for bull 1 compared to bull 6. Additionally, bull 1 demonstrated higher (P = 0.0001) Form Factor, lower (P = 0.0025) Antero-posterior Symmetry and larger (P = 0.0141) Fourier 1 than bull 6. In the post-challenge evaluation, greater visual motility (P = 0.0002) and vigor (P = 0.0005) were observed for bull 6 compared to bull 1. Only for the morphometric sperm trait Form Factor the differences between bulls 1 and 6 remained present, inferring that this sperm characteristic is intrinsic to bull 1. Regarding to the DNA integrity, no differences were observed between the bulls evaluated, before or after challenge. It was concluded that the laboratory challenge here proposed allowed to identify differences in the *in vitro* resistance of semen samples from different bulls, considering the parameters visual motility and vigor, plasma membrane functionality and total and progressive motility of CASA. However, further studies are needed to confirm the real capacity of the present laboratory challenge to identify bulls with higher and/or lower conception rates.

Keywords: Fertility, bull effect, laboratory challenge, sperm characteristics.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valor de p da análise de variância após avaliação por regressão logística de cada fator individual e das interações entre eles.....	42
Tabela 2. Taxa de concepção após inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de vacas múltiparas da raça Nelore (40 a 50 dias pós-parto), de acordo com o touro.....	42
Tabela 3. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros da análise convencional de sêmen depois da descongelação (grupo controle)	43
Tabela 4. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros da avaliação pelo CASA de sêmen depois da descongelação (grupo controle).....	43
Tabela 5. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros morfométricos do teste de azul de toluidina do sêmen pós-descongelação (grupo controle)..	44
Tabela 6. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros de integridade da cromatina do teste de azul de toluidina do sêmen depois da descongelação (grupo controle)	44
Tabela 7. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros da análise convencional de sêmen após desafio laboratorial (grupo desafio)	45
Tabela 8. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros da avaliação pelo CASA de sêmen após desafio laboratorial (grupo desafio)	45
Tabela 9. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros morfométricos do teste de azul de toluidina do sêmen após desafio laboratorial (grupo desafio)	46
Tabela 10. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros de integridade da cromatina do teste de azul de toluidina do sêmen após o desafio laboratorial (grupo desafio)	46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema do protocolo de IATF utilizado a campo: P4: progesterona; BE: Benzoato de estradiol; eCG: Gonadotrofina coriônica equina; PGF2 α : prostaglandina F2 α ; CE: Cipionato de estradiol; D0: dia 0 do protocolo hormonal; D9: dia 9 do protocolo; D11: dia 11 do protocolo; D41: Dia 41 do protocolo; IA: Inseminação artificial; DG: Diagnóstico de gestação.....**36**
- Figura 2.** Diagrama de fluxo do delineamento experimental: (b): Descongelamento a 37 °C por 30 segundos; (b): Avaliação espermática (grupo controle); (c): Preparação e montagem do gradiente descontínuo de Percoll (45%-90%); (d): Centrifugação do sêmen com o Percoll, 410g x 10 min, temperatura ambiente; (e): Mistura de gases em saquinho plástico. 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂; (f): Incubação por 2 horas e, estufa com atmosfera controlada; (g): Avaliação espermática pós desafio..... **37**
- Figura 3.** Sistema CASA: microscópio óptico com câmara acoplada e câmara de Makler... **39**
- Figura 4.** Teste de azul de toluidina: (a): Fixação do esfregaço em etanol 70%: ácido acético puro (1 minuto) e etanol 70% (3 minutos); (b): Tintura do esfregaço com azul de toluidina (pH 4,0); (c): Captura de imagens em microscópio óptico de luz com câmera e software acoplado.....**40**

LISTA DE ABREVIATURAS

- ALH** = Amplitude médio de deslocamento lateral da cabeça
- AMP cíclico** = Adenosina 3',5'-monofosfato **cíclico**
- ANOVA** = Análise de variância
- BCF** = Frequência de Batimento Flagelar
- BE** = Benzoato de estradiol
- BSP** = Proteínas de união espermática (“*Binder sperm proteins*”)
- CASA** = Análise computadorizada do sêmen (“Computer-Assisted Semen Analysis”)
- CBRA** Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
- CO₂** = Dióxido de carbono
- CV** = Coeficiente de variação da intensidade de tons de cinza de cada cabeça espermática, o qual representa a heterogeneidade cromatínica
- DG** = Diagnostico de gestação
- Dif%** = Porcentagem de espermatozoides com cromatina considerada descompactada na amostra
- DMA** = Porcentagem de defeitos maiores
- Dme** = Porcentagem de defeitos menores
- Dtot** = Porcentagem de defeitos menores
- DNA** = Ácido Desoxirribonucleico (“*Deoxyribonucleic Acid*”)
- ECC** = Escore de condição corporal
- eCG** = Gonadotrofina coriônica equina
- ECP** = Cipionato de estradiol
- ELIP** = Eliptisidade
- ERRO** = Espécies reativas do oxigênio
- F (0-2)** = Fourier 0 ao 2
- FF** = Fator de forma
- GnRH** = Hormônio liberador de gonadotrofinas
- h** = Hora
- HOST%** = Porcentagem de células viáveis no teste hiposmótico
- Hz** = Herz
- IA** = Inseminação artificial
- IATF** = Inseminação artificial a tempo fixo
- i.m** = Intramuscular
- JUT** = Junção útero – tubárica
- L** = Litros
- L/C** = Relação largura: comprimento
- LF** = Menor fertilidade
- LIN** = Linearidade
- μL** = Microlitro
- μL** = Micrograma
- μm** = Micrometro
- MATLAB** = *MATrix LABoratory*

mL = Mililitro
mOsm = Miliosmole
mSOF = Médio de oviduto sintético
MF = Maior fertilidade
MT = Motilidade total (CASA)
MP = Motilidade progressiva (CASA)
MV = Motilidade visual
N2 = Nitrogênio
O2 = Oxigênio
p = Valor de significância
P4 = Progesterona
PGF = Prostaglandina F2 alfa
pH = Potencial hidrogeniônico
PKA = Proteína quinase A
RA = Reação acrossomal
RAP % = Porcentagem de células rápidas (CASA)
SAP = Simetria anteroposterior
SCSA = Ensaio de estrutura cromatínica espermática
seg = Segundo
STR = Retilinearidade
TALP = *Tyrode/albumin/sodium lactate/sodium pyruvate*
TC% = Taxa de concepção
TRF = Trato reprodutivo feminino
VAP = Velocidade média da trajetória
VCL = Velocidade curvilínea
VSL = Velocidade em linha reta
ZP3 = Receptores glicoproteico de zona pelúcida 3
°C = Centígrados

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. Inseminação artificial a tempo fixo e a influência do Macho (“efeito touro”)	18
2.2. Transporte espermático no trato reprodutivo.....	19
2.2.1. Ambiente uterino e do oviduto.....	20
2.2.2. Capacitação espermática.....	22
2.2.3. Temperatura e atmosfera do trato reprodutivo.....	24
2.3. Análises laboratoriais.....	25
2.3.1. Motilidade espermática e vigor.....	25
2.3.2. Computer-assisted sperm analysis (CASA).....	26
2.3.3. Morfologia espermática.....	27
2.3.4. Concentração espermática do sêmen congelado.....	28
2.3.5. Funcionalidade da membrana plasmática-Teste hiposmótico.....	29
2.3.6. Avaliação da integridade do DNA – Azul de toluidina.....	30
3. HIPÓTESES.....	34
4. OBJETIVOS.....	34
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5.1. Local e período.....	35
5.2. Dados de Campo.....	35
5.3. Delineamento Experimental.....	36
5.4. Análise seminal do sêmen bovino.....	38
5.4.1. Análise convencional de sêmen.....	38
5.4.2. Análise computadorizada da cinética espermática.....	38
5.4.3. Integridade de membrana – Teste hiposmótico.....	38
5.4.4. Integridade de DNA - Teste de azul de toluidina.....	39
5.5. Análises estatísticas.....	41
5.5.1 Análise estatística – parte a campo.....	41
5.5.2 Análise estatística – parte laboratorial.....	41
6. RESULTADOS.....	42

6.1. Fertilidade em campo.....	42
6.2. Avaliação do grupo controle – pós descongelação.....	43
6.3. Avaliação do grupo desafio – pós desafio.....	45
7. DISCUSSÃO.....	47
8. CONCLUSÕES.....	52
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
I. APÊNDICE.....	64

1. INTRODUÇÃO

O sucesso da inseminação artificial no sistema pecuário bovino depende de inúmeros fatores. Dentre eles, podemos destacar fatores relacionadas com a fêmea bovina como categoria animal, nutrição, escore de condição corporal, crescimento folicular e muitas outras amplamente estudadas (BÓ et al., 2003; BÓ et al., 2007; BARUSELLI et al., 2004; PERRY et al., 2007; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009). Da mesma forma, com relação ao macho, o “efeito touro” e a qualidade do sêmen utilizados nos programas reprodutivos também apresentam alta relevância (VERTEGEN *et al*, 2002 ANDERSSON *et al*, 2004; TARTAGLIONE e RITTA, 2004; OLIVEIRA *et al*, 2012; SELLEM *et al*, 2015).

Além dos fatores biológicos envolvidos, manejo e ambiente também devem ser associados com a fertilidade dos animais (UTT, 2016). Cabe ainda destacar a importância das interações que acontecem desde o momento que o material genético do macho é inseminado até o momento que este fertiliza o ovócito (HAWK, 1983). Assim, não se pode deixar de considerar que todo o processo de trânsito espermático, bem como as mudanças e eventos que acontecem no espermatozoide durante sua passagem pelo trato reprodutivo feminino (TRF) são um grande desafio para os espermatozoides, mas de grande importância para que essas células adquiram seu potencial reprodutivo e a fecundação seja bem-sucedida (LEFEBVRE *et al*, 1997; GUALTIERI e TALEVI, 2000, MILLER, 2018; SAINT-DIZIER *et al*, 2020).

Até o momento da fecundação, os espermatozoides devem apresentar integridade estrutural e viabilidade funcional adequada de cada componente celular para que a célula seja capaz de sobreviver e fertilizar o ovócito (MUIÑO-BLANCO *et al*, 2008; JANUSKAUSKAS *et al*, 2001; SERAFINI *et al*, 2015; UTT, 2015). Neste sentido, muitos testes de análises seminais auxiliam na avaliação de diferentes características espermáticas e estão associadas com qualidade seminal e potencial fertilizante dos espermatozoides (UTT, 2015). Porém, os pesquisadores concordam que a avaliação de um parâmetro isolado não é capaz de garantir a total predição da fertilidade (CORREA E ZAVOS, 1994; JANUSKAUSKAS *et al*, 2001; VERSTEGEN *et al*, 2002; ARRUDA *et al*, 2011; NAGY *et al*, 2013; OLIVEIRA *et al*, 2013; SOUZA *et al*, 2018). Assim, a associação de vários testes de qualidade espermática é fundamental para melhorar a acurácia e estimar o potencial reprodutivo da amostra seminal de cada indivíduo (JANUSKAUSKAS *et al*, 2001; OLIVEIRA *et al*, 2013; SELLEM *et al*, 2015; SERAFINI *et al*, 2015; UTT, 2015; KUTCHY *et al*, 2019). Considerando os aspectos acima relatados, uma avaliação espermática de múltiplos fatores, que permita analisar amostras seminais baseando-se na mimetização de algumas características e/ou condições do trato reprodutivo das vacas, pode vir

a ser uma interessante alternativa para inferir a qualidade seminal dos touros. Deste modo, alguns aspectos biológicos devem ser levantados para desenvolver um teste *in vitro* de resistência seminal.

A centrifugação do sêmen em gradiente de densidade, além de selecionar espermatozoides de maior motilidade e/ou integridade de membrana (mimetizando o processo seletivo *in vivo* no trajeto percorrido pelos espermatozoides desde o útero até a junção útero tubárica; ARIAS *et al.*, 2016; SEPULVEDA *et al.*, 2017), pode ainda favorecer a remoção de fatores decapacitantes da superfície da membrana, evento associado com a capacitação espermática que acontece ao longo do trânsito espermático pelo TRF (LENZ *et al.*, 1983; LEFEBVRE *et al.*, 1997; GUALTIERI e TALEVI, 2000; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Adicionalmente, o uso de substâncias como a heparina e alguns íons podem favorecer a modulação de processos espermáticos que acontecem durante o trânsito na tuba uterina, como a capacitação espermática, sem alterar a viabilidade espermática ou o potencial seminal da amostra (PARRISH *et al.*, 1988; PARRISH *et al.*, 1989; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Ainda, a heparina pode se tornar um desafio adicional nas populações espermáticas resistentes a se capacitar, depois de passar pela centrifugação no gradiente de densidades (HENNING, TOGO & WABERSKI, 2015).

A incubação em ambiente controlado com baixa concentração de oxigênio e dióxido de carbono pode mimetizar o ambiente do TRF das vacas após a inseminação. Sugere-se que 37°C a 39,0°C seja a temperatura ideal fisiológica para os processos reprodutivos (LENZ *et al.*, 1983) e que a baixa concentração de O₂ no útero (2%) e na tuba uterina (entre 5 e 8%) mantém a funcionalidade espermática para a realização adequada dos processos reprodutivos (THOMPSON *et al.*, 1990; BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2007; MORIN, 2017). Assim, condições com 5% de O₂ e 5% de CO₂ proporcionam ambiente com baixa oxigenação semelhante ao TRF (onde a concentração de oxigênio pode ser 40% mais baixa do que a atmosférica), e com menor interferência e efeitos deletérios por parte das espécies reativas do oxigênio (CORMIER & BAILEY, 2003; LAPOINTE & BILODEAU, 2003).

Baseado neste cenário, acreditamos que através de um teste *in vitro* de resistência seminal (que avalie diferentes características espermáticas depois de submeter os espermatozoides a condições laboratoriais que mimetizem algumas das condições e desafios fisiológicos do TRF), sejam detectadas diferenças na resistência de amostras de sêmen de reprodutores bovinos que apresente relação mais assertiva com a fertilidade a campo. Assim, desenvolvemos um novo método de análise seminal *in vitro* (o qual será aqui denominado “desafio laboratorial”) a fim de associar as características seminais *in vitro* com a fertilidade *in vivo* dos diferentes touros avaliados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Inseminação artificial a tempo fixo e a influência do macho (“efeito touro”).

No Brasil, aproximadamente 90% dos animais que são submetidos à inseminação artificial são manejados com protocolos de IATF, diminuindo necessidade de detecção de estro e otimizando o uso de sêmen congelado (BARUSELLI, 2021). Além de ser uma importante ferramenta de manejo bovino por aumentar a taxa de serviço dos rebanhos, a IATF também pode diminuir o anestro pós-parto por induzir a ciclicidade dos animais em anestro, favorecendo ainda mais o ganho econômico e genético (BARUSELLI *et al.*, 2004; MADUREIRA & PIMENTEL, 2005; BARUSELLI, 2021).

Nos países da América do Sul, devido principalmente à predominância de gado *Bos indicus*, o uso de protocolos a base de estrógenos e progestágenos (ou P4) correspondem ao tratamento mais utilizado para a IATF de bovinos (BÓ *et al.*, 2003; BARUSELLI *et al.*, 2004; MADUREIRA & PIMENTEL, 2005; MENEGHETTI *et al.*, 2009; SÁ FILHO *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2012)

A administração de benzoato de estradiol (BE) associado à inserção de dispositivos liberadores de P4 no primeiro dia do programa (dia 0) resulta em sincronização da emergência de uma nova onda de crescimento folicular. A administração de PGF aplicada no dia da remoção do dispositivo (por volta do dia 8), tem por finalidade causar a lise do corpo lúteo (CL) possivelmente existente. Comumente, no dia da remoção do dispositivo de P4, realiza-se a aplicação de cipionato de estradiol (ECP) e gonadotrofina coriônica equina (eCG). O ECP tem a finalidade de sincronizar, sob baixas concentrações de progesterona circulante, a indução do pico de GnRH/LH e a ovulação dos animais. A eCG, tem a finalidade de aumentar a taxa de ovulação e o diâmetro do folículo pré-ovulatório em animais em anestro e/ou com baixo ECC. Normalmente, a IATF ocorre 48 a 60 horas após a remoção do dispositivo de P4 (BÓ *et al.*, 2003; BARUSELLI *et al.*, 2004; MADUREIRA & PIMENTEL, 2005; SÁ FILHO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Embora seja indiscutível a importância da IATF nos sistemas de produção de gado de corte, os estudos apontam índices médios de concepção muito variáveis, entre 40 e 65% para gado de corte (BÓ *et al.*, 2003; BARUSELLI *et al.*, 2004; MADUREIRA & PIMENTEL, 2005; MENEGHETTI *et al.*, 2009; SÁ-FILHO *et al.*, 2009; CRESPILO, 2010; SÁ-FILHO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2019; NORONHA *et al.* 2020).

Muitas causas podem ser responsáveis a grande variação de resultados nos programas de IATF. Existem os fatores relacionados com a fêmea bovina como ECC, raça, categoria animal, tamanho do folículo dominante, entre outros (BÓ *et al.*, 2003; BÓ *et al.*, 2007; BARUSSELLI *et al.*, 2004; PERRY *et al.*, 2007; MENEGHETTI *et al.*, 2009; SÁ FILHO *et al.*, 2009; SÁ FILHO *et al.*, 2010). Adicionalmente, a qualidade das amostras seminais pode apresentar grande influência no sucesso destes programas reprodutivos (CRESPILHO, 2010; OLIVEIRA, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012; DINIZ *et al.*, 2021).

O sucesso dos programas de IA depende, em grande parte, do uso de touros de boa fertilidade (OLIVEIRA, 2012). Diversos trabalhos já demonstraram uma grande variação de fertilidade entre touros, tanto *in vitro* (HILLERY *et al.*, 1990; MARQUANT-LE GUIENNE *et al.*, 1990; SHI *et al.*, 1990; ZHANG *et al.*, 1997; WEI & FUKUI, 1999; SUDANO *et al.*, 2011; SELLEM *et al.*, 2015, MORREL *et al.*, 2018) como *in vivo* (CORREA, PACE & ZAVOS, 1997; ZHANG *et al.*, 1999; WARD *et al.* 2001, ANDERSSON *et al.* 2004; SÁ FILHO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012; MOHANTY *et al.*, 2015). Com relação a influência do “efeito touro” avaliada a campo, JANUSKAUSKAS *et al.* (1996) aportaram informações demonstrando a relação da fertilidade com a concentração espermática. CORREA, PACE & ZAVOS (1997) demonstraram que motilidade e morfologia são características seminais positivamente associadas com o potencial fértil dos touros. ANDERSSON *et al.* (2004) reportaram que a interação touro vs. inseminador influencia os resultados dos programas de IA e que a dose inseminante apresenta efeitos significativos na fertilidade, dependendo do macho utilizado. SÁ FILHO *et al.* (2009) observaram grande variação na taxa de gestação de acordo com o touro utilizado, caracterizando-se que, assim como o inseminador, o touro foi considerado um fator crítico para o sucesso dos programas de IATF. Ainda, NAGY *et al.* (2013) indicou que uma alta proporção de espermatozoides morfologicamente normais foi um importante preditor de fertilidade para touros na IA.

2.2. Transporte espermático no trato reprodutivo

As interações que os espermatozoides depositados sofrem através do TRF são um conjunto de eventos e obstáculos que vão favorecer a fertilidade dos espermatozoides que superam os desafios impostos pelo mesmo; ou seja, a sucessiva ocorrência de eventos que o espermatozoide é submetido ao longo do trânsito espermático na fêmea favorece o objetivo do gameta masculino em fertilizar o ovócito. Porém, cabe destacar que, na inseminação artificial, quando

o sêmen é depositado no útero das vacas, evita-se o processo seletivo inicial que acontece dentro do fluido do lúmen vaginal e nas secreções da cérvix (MILLER, 2018).

A resposta do sistema imune começa no útero imediatamente após a inseminação. Espermatozoides que não são fagocitados ou afetados pela imunidade da fêmea seguem seu trajeto até a tuba uterina, assegurando assim a chegada de espermatozoides de melhor qualidade no oviduto (MILLER, 2018). Assim, a presença de espermatozoides anormais ou com motilidade comprometida, células mortas e/ou células com proteínas defeituosas pode desencadear o influxo de substâncias quimiotáticas favorecendo a chegada de anticorpos e leucócitos na luz uterina, ocorrendo fagocitose. Desta forma, a ação de citocinas age na eliminação de células espermáticas, moléculas do plasma seminal e microrganismos para gerar um melhor ambiente para as células sobreviventes e com melhores características para atingir o nível mais alto do TRF (RICKARD e GRAAF, 2020). Destaca-se ainda que os espermatozoides são transportados rapidamente após inseminação para a tuba uterina em duas fases: uma fase inicial rápida, onde uma quantidade pequena de células é levada mecanicamente em pouco tempo até o oviduto, a qual dura aproximadamente 15 minutos; seguida por uma segunda fase mais lenta através do útero, com maior duração, entre 6 e 12 horas até a junção útero tubárica (HAWK, 1983; HUNTER & WILMUT, 1984). Assim, a íntima interação entre células epiteliais do istmo e os espermatozoides de melhores características acabam por estabelecer o reservatório espermático (PARRISH *et al.*, 1989; RICKARD e GRAAF, 2020).

2.2.1. Ambiente uterino e do oviduto

Dentro do útero, os espermatozoides têm interações com o tecido e o ambiente local, onde são encontradas ligações celulares de alguns dos espermatozoides com o epitélio glandular uterino (AKUTHAR, 2019), favorecendo a retenção de gametas de menor qualidade (pela ativação do sistema imune e a subsequente resposta inflamatória aguda) sem afetar o conjunto celular que vai atingir a tuba uterina (MILLER, 2018). Porém, existe também outro tipo de modulação molecular da fisiologia espermática através da secreção de vesículas extracelulares desde o útero, conhecidos também como uterosomas (QIAO *et al.*, 2018), que podem interferir na capacitação espermática durante o trânsito dos espermatozoides pelo TRF (SAINT-DIZIER *et al.* 2020).

Durante o transporte espermático, os espermatozoides devem passar desde o útero até a parte inferior da tuba uterina, o istmo. A junção útero-tubárica (JUT) funciona como uma área de interfase entre os tecidos do útero e istmo (WROBEL e KUJAT, 1993) e serve de barreira

anatômica para a entrada de espermatozoides (SUAREZ e PACEY, 2006). A migração espermática através da JUT para atingir o oviduto é resultado de fatores masculinos e femininos importantes; por exemplo, as características seminais são um fator indispensável, principalmente morfologia e motilidade espermática, para que os espermatozoides colonizem o istmo (SAINT-DIZIER *et al* 2020), e pelo lado feminino, a barreira física e anatômica que caracteriza essa estrutura em diferentes períodos do estro (WROBEL e KUJAT, 1993), a composição da secreção mucosa e a habilidade oportuna do tecido ovidutal para fazer do istmo o reservatório espermático (MILLER, 2018). Adicionalmente, existe um batimento ciliar na região, que favorece o transporte espermático de células viáveis ao ponto da fertilização e a remoção de células com baixa qualidade da tuba uterina (ISHIKAWA *et al*, 2016).

A passagem através da JUT pode ser reconhecida como um método de seleção, onde uma subpopulação de células com qualidade superior, portadoras de melhor motilidade, integridade de acrossomo e normalidade morfológica, e inclusive a presença de características moleculares na superfície celular, vão atingir a tuba uterina (LEFEBVRE *et al*, 1997; GUALTIERI e TALEVI, 2000). No entanto, este processo ainda é um mistério em muitos dos mamíferos. Interessantemente, em ratos, já foram descritas moléculas específicas necessárias para que os espermatozoides consigam atravessar a junção, apesar de ter motilidade e morfologia normais (NAKANISHI *et al*, 2004).

Como mencionado anteriormente, espermatozoides que colonizam a tuba uterina tem melhores características cinéticas e morfológicas, de modo que estas células na sua grande maioria vão interagir com as células epiteliais do oviduto (inicialmente no istmo) através de propriedades específicas das secreções e do ambiente celular, para formar um reservatório espermático funcional (HUNTER *et al* 1980), com o objetivo de que adquiram maior longevidade (ORR e ZUK, 2014).

Porém, o reservatório espermático não é só um lugar de armazenamento celular, a adesão celular que acontece nesse lugar que é favorecida principalmente pelos glicosaminoglicanos e o ambiente iônico, que leva os espermatozoides a suprimir temporalmente a capacitação (RODRIGUEZ – MARTINEZ, 2007) e conservar a motilidade espermática no tempo para manter a capacidade fertilizante das células (POLLARD *et al*, 1991) até o momento mais adequado, quando a fêmea está perto da ovulação.

Na tuba uterina, um fluido viscoso é encontrado no lúmen, possivelmente originado desde o transudado seletivo do sangue (SAINT-DIZIER *et al* 2020), e pela produção desde as células epiteliais, classificadas como células ciliadas e as não ciliadas, sendo as segundas as que têm principalmente função secretória dependente do ambiente iônico e hormonal (LEESE *et al*,

2001), podendo ser mais desenvolvidas em atividade e tamanho quando os estrógenos estão presentes (MURRAY, 1995). Adicionalmente, não só existem as propriedades reológicas e endócrinas do fluido, existem também diferenças entre regiões da tuba relacionadas ao pH, osmolaridade e conteúdo de moléculas específicas nesta secreção (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007), como por exemplo proteínas, lipídios, glicoproteínas, lipoproteínas, proteoglicanos, enzimas antioxidantes, íons e outros, que vão modular o ambiente e a função espermática para o consequente processo de fertilização na ampola da tuba uterina (LESSE *et al*, 2001).

Portanto, os constituintes do fluido da tuba uterina orquestram várias das mudanças e funções espermáticas relacionadas a esse lugar anatômico, como a ligação espermática com o epitélio, a manutenção da viabilidade e motilidade dos espermatozoides, o processo de liberação celular do reservatório espermático e a modulação da capacitação espermática até o momento da fertilização (POLLARD *et al*, 1991; LEFEBVRE *et al*, 1995; LESSE *et al*, 2001; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007; LAMY *et al*, 2017; LAMY *et al*, 2018; SAINT-DIZIER *et al*, 2020).

2.2.2. Capacitação espermática

A capacitação é uma cascata gradual de eventos de um processo que ocorre dentro da tuba uterina, em que os espermatozoides adquirem a capacidade de se fundir à zona pelúcida para ser capazes de fertilizar o ovócito (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Este processo inicia com a remoção das proteínas associadas ao plasma seminal (*BSP*, por suas siglas em inglês) da superfície dos espermatozoides. Quando estas moléculas estão presentes, cobrindo as células espermáticas, elas favorecem uma melhor estabilização da membrana plasmática. Quando estas BSP's interagem com outras substâncias como lipoproteínas de alta densidade, albumina e glicosaminoglicanos (como a heparina), desencadeiam o efluxo de colesterol desde a membrana plasmática, alterando assim sua estabilidade e favorecendo a capacitação (PARRISH *et al*, 1988; EHRENWALD *et al*, 1990; MANJUNATH e THÉRIEN, 2002).

A perda da estabilidade na membrana espermática se deve principalmente às alterações composicionais e interações iônicas e bioquímicas presentes na tuba uterina. Com a saída de colesterol e a remoção de fatores decapacitantes, a relação do colesterol com fosfolipídios de membrana vai ser alterada e assim esta estrutura celular vai ficar mais fluida e reativa ao meio externo (HUNG e SUAREZ, 2010).

As modificações estruturais sofridas pela membrana plasmática afetam também sua própria permeabilidade a algumas substâncias e componentes do meio da tuba uterina, desencadeando processos associados à capacitação (GADELLA e LUNA, 2014). A regulação do cálcio intracelular é talvez o pivô sinalizador do processo de capacitação, de modo que este íon, quando em concentrações aumentadas dentro dos espermatozoides (CORMIER *et al.*, 1997), vai gerar mudanças bioquímicas importantes para todo o processo, incluindo a ativação de segundos mensageiros como o AMP cíclico (VISCONTI *et al.*, 1998), regulação do pH, de enzimas proteína quinases e a fosforilação de resíduos de aminoácidos (BREITBART e NAOR, 1999; GADELLA e LUNA, 2014), que vão permitir a modulação do transporte iônico e dos eventos subsequentes.

A mobilização do cálcio extracelular para dentro das células é regulado principalmente por canais ou bombas transmembrana dependentes de voltagem ou por co-transportadores na membrana plasmática (THUNDATHIL *et al.*, 2018). Adicionalmente, o influxo de cálcio através de canais de cátions da membrana espermática interfere nos processos de hiperativação (HO *et al.*, 2009) e reação acrossomal (RA) subsequentes (THÉRIEN e MANJUNATH, 2002).

Junto com o cálcio, o bicarbonato é outro íon de grande importância na regulação e sinalização da capacitação. O bicarbonato possui importância iônica na regulação intracelular dos espermatozoides e uma interação extracelular na tuba uterina, tendo ainda a capacidade de alcalinizar e aumentar o pH na célula (BREITBART e NAOR, 1999) desde aproximadamente 6,7 quando a célula não está capacitada até mais de 6,95 quando está se capacitando (PARRISH *et al.*, 1999). No meio ovidutal, são encontrados valores de pH entre 7,5 a 8,5 aproximadamente, no istmo e ampola, respectivamente, graças as altas concentrações de bicarbonato presente (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007).

Também é conhecido que o bicarbonato possui várias vias efetoras da capacitação, por ter a capacidade de desencadear a saída de lipídios da bicamada lipídica modificando sua fluidez (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Através da ativação de mensageiros bioquímicos para produzir o AMP cíclico (GADELLA e LUNA, 2014) consegue estimular a proteína quinase A (PKA) e com isto a fosforilação da tirosina (VISCONTI *et al.*, 1998; MCGETRICK *et al.*, 2014), que subsequentemente vai interagir com a sinalização gerada pelo cálcio intracelular.

São ainda muitos os estudos tentando elucidar como o processo de capacitação dos espermatozoides está relacionado com o reservatório espermático e como estas alterações celulares estão relacionadas com a fertilidade em condições de monta natural e inseminação artificial (GADELLA e LUNA, 2014; RICKARD e DE GRAAF, 2020).

Quando as células passam pelo processo de capacitação, elas mantêm altos níveis de cálcio intracelular que vão favorecer a ocorrência da RA (GADELLA e LUNA, 2014). A RA é basicamente a fusão da membrana acrossomal externa com a membrana plasmática, levando a extrusão de enzimas que permitirão que o espermatozoide atravesse o *cumulus oophorus*, e é induzida pelo contato com receptores glicoproteicos da zona pelúcida, ZP3 (THÉRIEN e MANJUNATH, 2003).

Portanto, *in vivo*, para que ocorra a RA, as proteínas de superfície do acrossomo e o colesterol da membrana plasmática devem ser removidas nos processos anteriormente mencionados (EHRENWALD *et al*, 1990). Para possibilitar a ocorrência da capacitação espermática *in vitro*, usualmente realiza-se o lavado e centrifugação do sêmen, ou ainda o processo de seleção espermática exercida pelo interior de gradientes descontínuos de densidade (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007).

2.2.3. Temperatura e atmosfera do trato reprodutivo

A temperatura é de grande importância para os processos desenvolvidos no TRF, visto que muitos dos eventos associados com a fertilização do ovócito são dependentes da temperatura, inclusive a capacitação e a RA (PARRISH *et al*, 1988). Entende-se que entre 37°C a 39°C é a temperatura ideal para a adequada ocorrência dos processos reprodutivos (LENZ *et al*, 1983).

Uma característica interessante do ambiente no trato reprodutivo dos mamíferos é a baixa concentração de pressão de oxigênio, com menos de 40% da pressão de O₂ do que o meio atmosférico, que possui 20% de O₂ (FISCHER e DAVISTER, 1993). Assim, a baixa concentração de O₂, que se encontra em aproximadamente 5 a 8% na tuba uterina e 2% no útero (THOMPSON *et al*, 1990; BALASUBRAMANIAN *et al*, 2007; MORIN, 2017) vai favorecer os processos fisiológicos estabelecidos nestas duas regiões. Com relação à presença e a concentração de outros gases como o CO₂ ou o N₂ no ambiente uterino das vacas pouco tem sido estudado; mas extrapolando pesquisas feitas na espécie suína, a concentração fisiológica no meio uterino de CO₂ seria de aproximadamente 13 a 14% independente do estágio do ciclo estral (LÓPEZ-ALBORS *et al*, 2021).

Baixas quantidades de oxigênio são indispensáveis para a formação de uma quantidade inofensiva de espécies reativas do oxigênio (EROs) que têm funções importantes na fisiologia espermática, como a ativação do processo de capacitação e RA (CORMIER e BAILEY, 2003). No entanto, quando a síntese de EROs aumenta e existe deficiência nos sistemas antioxidantes

sintetizados pela fêmea (LAPOINTE e BILODEAU, 2003) ou pelo macho, ocorrerá um estado de estresse oxidativo, onde as células espermáticas são especialmente susceptíveis (BOLLWEIN e BITTNER, 2018).

O aumento das EROs pode ter como origem algumas fontes intracelulares ou extracelulares. A maior produtora de metabólitos oxidantes é a mitocôndria, tanto pelo metabolismo mitocondrial na peça intermediária através da ação de enzimas oxidativas como pela cadeia de transporte de elétrons (BOLLWEIN e BITTNER, 2018). Além das organelas, a atividade leucocitária e os processos de criopreservação e descongelamento favorecem o aumento da produção de EROs. Adicionalmente, a diminuição dos sistemas antioxidantes extracelulares no sêmen (PONS-REJRAJI, BAILEY e LECLERC, 2009) favorecem o estresse oxidativo e acabam por desenvolver alterações nas células susceptíveis.

2.3. Análises laboratoriais

2.3.1. *Motilidade espermática e vigor*

Vários testes laboratoriais têm sido desenvolvidos para melhorar a estimativa do potencial reprodutivo do macho. A avaliação microscópica da motilidade e a morfologia espermática são considerados dois importantes preditores da fertilidade (UTT, 2015).

Entre as avaliações mais frequentemente utilizadas para a avaliação da qualidade espermática está a avaliação da porcentagem de células moveis, e a intensidade ou força com que as células conseguem se deslocar, chamadas de motilidade espermática e vigor espermático, respectivamente. Estes são testes rotineiros e clássicos para avaliar a qualidade do sêmen (JANUSKAUSKAS *et al*, 2001; SERAFINI *et al*, 2015; UTT, 2015).

Geralmente nos mamíferos, a motilidade e o vigor são características importantes para o transporte espermático dentro do TRF e a penetração do ovócito no oviduto. Acredita-se que células sem motilidade progressiva ou capacidade de movimento restringida por diferentes fatores, apresentem baixas probabilidades de chegar à junção útero-tubárica e passar ao oviduto para o processo de fertilização (MUIÑO-BLANCO *et al*, 2008), enquanto espermatozoides com motilidade vigorosa apresentam-se beneficiados para o processo de fertilização por habilitar a entrada dentro das células do cumulus, coroa radiada e a zona pelúcida (SIMON E LEWIS, 2011).

Entretanto, embora a avaliação da motilidade esteja entre os principais parâmetros relacionados com a qualidade espermática em amostras de sêmen criopreservado, a análise visual

e subjetiva deste parâmetro fazem com que este método de avaliação tenha alto nível de imprecisão e baixa repetibilidade (BERNDTSON *et al*, 1980; NAGY *et al*, 2015). Portanto, sistemas de avaliação mais objetivos podem ser associados a diversos outros testes laboratoriais para melhorar a acurácia da avaliação da qualidade seminal (SELLEM *et al*, 2015; KHALIL *et al*, 2018).

2.3.2 Computer-assisted sperm analysis (CASA)

Para substituir a análise de motilidade e vigor espermático, diversas empresas e centros de pesquisa têm utilizado técnicas automatizadas como o *Computer-assisted sperm analysis* (CASA), sistema com capacidade de analisar de forma mais objetiva e replicáveis múltiplas variáveis cinéticas com maior acurácia (NAGY *et al*, 2015).

A análise computadorizada do sêmen tem sido uma ferramenta importante na avaliação andrológica a nível investigativo e clínico (VERSTEGEN *et al*, 2002) onde parâmetros numéricos da cinética de um grande número de células de uma amostra seminal são o principal foco da avaliação (MORTIMER, 2000; MUIÑO *et al*, 2008).

Os parâmetros cinéticos normalmente analisados são: Motilidade total (MT; %); Motilidade progressiva (MP; %); Velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), relacionada com a velocidade média na trajetória da cabeça espermática ao longo da sua trajetória real; Velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$), caracterizada pela velocidade média na trajetória da cabeça espermática em linha reta desde um ponto inicial até um ponto final; Velocidade média da trajetória (VAP, $\mu\text{m/s}$), caracterizada pela velocidade média da cabeça espermática ao longo da sua trajetória média; Porcentagem de linearidade (LIN, %), razão entre VSL e VCL, e está relacionada com a proximidade da trajetória do espermatozoide com uma linha reta; Porcentagem de retilinearidade (STR, %), é a razão entre VSL e VAP e faz referência à relação do espaço percorrido em linha reta e o percurso médio do espermatozoide; Amplitude médio de deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), é o valor médio do movimento extremo de uma lado para outro da cabeça espermática em sua trajetória real, associado a um ciclo de batimento do flagelo; Frequência de Batimento Flagelar (BCF, Hz), é a frequência com a qual a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento ao longo do seu caminho (MORTIMER, 1997; MORTIMER, 2000; VERSTEGEN *et al*, 2002; MATOS *et al*, 2008; MUIÑO *et al*, 2008).

Cabe, porém, destacar que a amostra deve seguir recomendações técnicas para a análise (VERSTEGEN *et al*, 2002). Um técnico experiente, a manutenção da temperatura em 38°C e

conhecimentos sobre o processamento de sêmen e os diluentes são fatores importantes que podem interferir na análise espermática (MATOS *et al*, 2008). A concentração da amostra também é um fator importante para a avaliação, uma vez que o alto número de células pode alterar a capacidade do sistema para predizer as características cinemáticas de cada espermatozoide individualmente, o que poderia alterar o resultado de inúmeros parâmetros de motilidade da amostra. Portanto, recomenda-se não utilizar uma concentração maior que $40 \times 10^6/\text{mL}$ (MORTIMER, 2000).

Considerando uma análise realizada dentro das recomendações, a avaliação computadorizada de amostras criopreservadas pode nos permitir diferenciar algumas características espermáticas entre touros (KUTCHY *et al*, 2019). Alguns trabalhos já demonstraram que as características cinemáticas dos espermatozoides podem estar correlacionadas com a fertilidade (JANUSKAUSKAS *et al*, 2001; MORTIMER, 2000).

2.3.3. Morfologia espermática

A morfologia celular é outra característica importante na avaliação de qualidade espermática do macho (JANUSKAUSKAS *et al*, 2001). A importância desta avaliação está relacionada com seu papel indicativo de processos anormais na espermatogênese e maturação espermática no epidídimo (VERSTEGEN *et al*, 2002). Patologias associadas com as glândulas anexas ou falhas nos procedimentos de coleta e manuseio do sêmen também podem causar alterações de morfologia espermática. Conseqüentemente, as análises de anormalidades morfológicas devem ser criteriosamente analisadas, visto que sua etiologia e origem podem estar associadas com diminuição da fertilidade (NAGY *et al*, 2013; KHALIL *et al*, 2018).

A porcentagem de células anormais e sua classificação aportam informações sobre diferenças na fertilidade entre ejaculados e apresentam alta correlação com maiores taxa de não retorno (WOOD *et al*, 1986), enquanto altas porcentagens de normalidades morfológicas normalmente se relacionam com boa fertilidade (JANUSKAUSKAS *et al*, 2001; NAGY *et al*, 2013; SERAFINI *et al*, 2015).

No entanto, a ausência de problemas na morfologia espermática não garante que o indivíduo tenha alto potencial reprodutivo, assim como a presença de alterações na morfologia espermática pode não ser a única responsável pela baixa taxa de fertilidade que acomete um indivíduo. Portanto, inúmeros parâmetros espermáticos devem ser avaliados para estabelecer a etiologia da subfertilidade ou infertilidade (KUTCHY *et al*, 2019; SERAFINI *et al*, 2015; SAACKE, 2008).

2.3.4. Concentração espermática do sêmen congelado

Assim como a morfologia e motilidade, a concentração espermática é uma importante variável correlacionada com a fertilidade (SODERQUIS *et al*, 1991; JANUSKAUSKAS *et al*, 2001; VERSTEGEN *et al*, 2002; MUIÑO *et al*, 2008).

A dose inseminante do sêmen criopreservado pode estar direta e positivamente relacionado com a fertilidade (SCHWARTZ *et al.*, 1981), não excluindo a necessidade da presença de outras características desejáveis (como alta motilidade e baixas anormalidades morfológicas) relacionadas com boa qualidade seminal. Neste sentido, SHANNON e VISHWANATH (1995) demonstraram que palhetas de sêmen com concentrações de 5 milhões de espermatozoides apresentaram 8% menos de taxa de não retorno comparada com doses de 20 milhões de sêmen congelado. Um estudo comparou a concentração de 2 e 15 milhões de espermatozoides na palheta e sua relação com a taxa de prenhez. Os autores demonstraram que o grupo de menor concentração teve menor taxa de concepção, porém, dependendo do touro utilizado, alta variabilidade foi observada nos resultados de fertilidade (ANDERSSON *et al*, 2004). Entretanto, foi proposto que uma concentração de 15 milhões de espermatozoides por palheta era o valor necessário para atingir a máxima fertilidade dos touros (JANUSKAUSKAS *et al*, 2001). No entanto, uma palheta convencional de sêmen congelado pode ter entre 20 e 30 milhões de espermatozoides com o objetivo de garantir entre 10 e 15 milhões de células com motilidade progressiva que permitam garantir um nível de fertilidade desejável (MOHANTY *et al*, 2018). Visto que o processo reprodutivo é dependente do transporte e sobrevivência espermática e a eventual fertilização, todos os obstáculos que se apresentam no trato reprodutivo vão interferir na quantidade de espermatozoides viáveis, de forma distinta entre touros (SCHWARTZ *et al*, 1981).

Segundo o CBRA (1998), a porcentagem mínima de viabilidade para sêmen descongelado deve ser igual ou superior a 70%, garantindo de 6 a 10 milhões de espermatozoides moveis pós-descongelação. De forma semelhante, outros autores recomendam uma motilidade maior que 50% quando a palheta tem ao redor de 15 milhões de células totais, para atingir uma taxa de concepção aceitável, de aproximadamente 70% de prenhez (SUAREZ E PACEY, 2006), não deixando de considerar que existe grande variação individual, de acordo com o touro em questão (MOHANTY *et al*, 2018). Entretanto, cabe destacar que o número de células na palheta, parâmetro diretamente relacionado com a concentração espermática, também está associado com a produção de radicais livres (BOLLWEIN e BITTNER, 2018). Um número excessivo de espermatozoides pode gerar efeitos negativos indesejáveis sobre a viabilidade celular devido

ao aumento do estresse oxidativo causada pelo aumento da atividade celular em uma amostra espermática mais concentrada (JANUSKAUSKAS *et al*, 2001; MURPHY *et al*, 2018; MORREL *et al*, 2018). Assim, adequada concentração espermática na palheta é fator importante para a obtenção de taxas de fertilidade satisfatórias da amostra seminal.

2.3.5. Funcionalidade da membrana plasmática - Teste hiposmótico

A membrana plasmática é uma estrutura fundamental para o metabolismo celular e para os processos associados com a fertilização, e tem a propriedade de permitir e regular o transporte seletivo de moléculas (JEYENDRAN *et al*, 1984) e por essa razão deve-se pensar em avaliar adequadamente sua integridade (JANUSKAUSKAS *et al*, 2001). Essa estrutura é altamente sensível à injúrias induzidas pela criopreservação, de modo que a membrana de uma porcentagem variável de células móveis comumente sofre injúrias e são inativadas após a manipulação e/ou processamento relacionados ao congelamento e descongelamento de sêmen (CORREA E ZAVOS, 1994).

Devido à importante função desta estrutura em várias etapas, desde a espermatogênese até a fertilização, esta pode se considerar uma importante característica para avaliar a capacidade fertilizante dos espermatozoides (CORREA E ZAVOS, 1994).

Existem várias metodologias para a avaliação da integridade da membrana plasmática, tanto na função física como funcional, que permitem diferenciar entre células viáveis e mortas. Entre os testes que avaliam essa característica espermática encontram-se o uso de corantes supra-vitais, como a eosina-nigrosina (FELIPE-PÉREZ *et al*, 2008), sondas fluorescentes, como o iodeto de propídio (KASIMANICKAM *et al*, 2006; KUTCHY *et al*, 2019) e o teste hiposmótico (JEYENDRAN *et al*, 1984) que indica indireta e subjetivamente a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática (UTT, 2015).

Inúmeros autores concordam que o teste hiposmótico pode contribuir significativamente para a avaliação da qualidade espermática convencional, conjuntamente com os outros testes, para melhorar a predição da taxa de fertilidade (JEYENDRAN *et al*, 1984; CORREA E ZAVOS, 1994; BRITO *et al*, 2003; TARTAGLIONE E RITTA, 2004; OLIVEIRA *et al*, 2013). Esta é uma ferramenta pouco onerosa, prática e com alta acurácia para avaliar a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides em diferentes indivíduos com fertilidade variável e em diferentes tipos de amostras, inclusive em sêmen descongelado (JEYENDRAN *et al*, 1984; CORREA E ZAVOS, 1994; ROTA *et al*, 2000; BACINOGLU *et al*, 2008).

A osmolaridade fisiológica do sêmen de touro está entre 280 e 300 mOsm (LAYANYA *et al*, 2021). Conforme anteriormente mencionado, a avaliação da membrana plasmática através do teste hiposmótico consiste na exposição das células espermáticas a condições hiposmóticas, gerando assim a entrada de água no interior delas, na tentativa de a membrana plasmática íntegra atingir o equilíbrio osmótico. Com este influxo de líquido as células ficam edemaciadas e o flagelo, altamente sensível ao estresse osmótico, vai ficando enrolado, indicando a habilidade de transportar água através da membrana plasmática dos espermatozoides normais, demonstrando integridade e funcionalidade bioquímica nessas células (JEYENDRAN *et al*, 1984).

A solução hiposmótica empregada para o teste deve ter uma osmolaridade mínima suficiente para gerar o edema da célula, mas não pode ser tão reduzida a ponto de provocar muito rapidamente uma lesão celular (ROTA *et al*, 2000; CORREA E ZAVOS. 1994). De maneira geral, um valor adequado de edema nos espermatozoides para a realização desse teste se apresenta quando eles são expostos a soluções hiposmóticas de 100 mOsm/L (CORREA, PACE E ZAVOS, 1997) por, pelo menos, cinco minutos (ROTA *et al*, 2000).

O teste hiposmótico tem uma correlação positiva ($r= 0,61$) com a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva e com membrana plasmática íntegra (JEYENDRAN *et al*, 1984; BRITO *et al*, 2003). CORREA & ZAVOS (1994), demonstraram alta correlação positiva com a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva ($r= 0,73$) e com integridade de membrana plasmática intactas mediante a coloração com eosina ($r= 0,81$). A integridade de membrana avaliada pelo teste hiposmótico tem sido ainda associada a taxa de fertilidade. Alta correlação positiva ($r=0,90$) foi observada em amostras com alta porcentagem de células que respondem ao teste hiposmótico com a fertilização *in vitro* de ovócitos de hamster (JEYENDRAN *et al*, 1984). Embora ROTA *et al*, (2000) não tenham encontrado correlação do referido teste com a fertilidade *in vitro*, outros autores sugerem que a realização do teste hiposmótico em amostras criopreservadas pode vir a auxiliar na distinção de touros com alta e baixa fertilidade *in vivo* (CORREA, PACE E ZAVOS, 1997; BACINOGLU *et al*, 2008) e *in vitro* (BRITO *et al*, 2003). Assim, considera-se que o teste hiposmótico pode contribuir significativamente para a avaliação da qualidade espermática convencional, conjuntamente com os outros testes, para melhorar a predição da taxa de fertilidade (BRITO *et al*, 2003).

2.3.6. Avaliação da integridade do DNA – Azul de toluidina

A rotina de avaliações do controle de qualidade espermática não inclui análises de DNA devido a necessidade de inclusão de técnicas mais especializadas e laboriosas (CORREA,

PACE E ZAVOS, 1997; JANUSKAUSKAS *et al*, 2001; VINCENT *et al*, 2012). Porém, sabe-se que a qualidade do DNA paterno é indispensável e de grande importância para o processo de fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário e fetal (SIMON e LEWIS, 2011; SELLEM *et al*, 2015; SERAFINI *et al*, 2015; CARREIRA *et al*, 2017).

A qualidade do DNA pode ser obtida por vários tipos de ensaios e provas específicas (CARREIRA *et al*, 2017). Testes focados na integridade e compactação da cromatina podem ser realizados através da citometria de fluxo com uso de sondas fluorescentes, como a laranja de acridina (JANUSKAUSKAS *et al*, 2001; KASIMANICKAM *et al*, 2006; SELLEM *et al*, 2015), ensaio de cometa alcalina (SERAFINI *et al*, 2015) e com corantes específicos com afinidade por moléculas do DNA para posterior avaliação microscópica e computadorizada, como a coloração pelo azul de toluidina (BELETTI *et al*, 2005; KIPPER *et al*, 2017; SOUZA *et al*, 2018; MARTINS *et al*, 2021).

Para entender como os testes de integridade do DNA funcionam é importante conhecer o processo de formação dos espermatozoides e entender algumas das particularidades do DNA espermático. Durante o processo final da espermatogênese, as espermátides passam por diferenciações celulares e moleculares para dar lugar aos espermatozoides, incluindo a eliminação do citoplasma residual, diminuição da atividade transcricional e condensação nuclear e cromatínica (SAKKAS *et al*, 2002; BELLETTI, COSTA E GUARDIEIRO, 2005). Neste momento, o genoma masculino contido no núcleo passa por mudanças que tornam o seu núcleo mais protegido e compactado, graças à mudança quase total de nucleossomas, compostos principalmente pelas histonas e por proteínas especializadas, chamadas de protaminas, que junto com ligações dissulfeto são encarregadas pela maior compactação da cromatina (BELLETTI, COSTA E GUARDIEIRO, 2005; SOUZA *et al*, 2018; KUTCHY *et al*, 2019). A sequência de DNA junto com as protaminas e a porcentagem restantes de histonas vão formar uma estrutura toroidal, conhecida como a unidade básica da cromatina espermática (FILHO, BELETTI E OLIVEIRA, 2015). Conseqüentemente, em situações de DNA descompactado, a cromatina apresentara-se heterogênea e susceptível a danos. Portanto, em situações em que se observa condensação anormal do material genético do espermatozoide, o genoma haploide masculino fica susceptível aos fatores externos que levam a prejuízos de fertilidade (KUTCHY *et al*, 2019; BELETTI *et al*, 2004).

A análise de integridade e compactação de DNA espermático também se destaca entre uma das ferramentas preditivas para determinar a taxa de fertilidade do sêmen dos reprodutores. Danos de DNA podem estar associados a defeitos na protaminação, lesões nas ligações dissulfeto entre as protaminas e/ou ruptura da fita dupla ou simples do DNA. Essas alterações podem

ser intrínsecas à célula espermática ou resultar de alterações físicas ou químicas que atingem o núcleo espermático, como por exemplo danos oxidativos e enzimáticos (SERAFINI *et al*, 2015; CARREIRA *et al*, 2017). Assim, o objetivo destes testes geralmente se concentra em determinar o grau de dano no DNA, por meio do grau de condensação da cromatina, uma vez que a avaliação deste componente é essencial para o sucesso da fertilização e desenvolvimento embrionário (BELETTI *et al*, 2004; SIMON e LEWIS, 2011; NAGY *et al*, 2013; UTT, 2015; SOUZA *et al*, 2018; KUTCHY *et al* 2019).

O teste de azul de toluidina para avaliação da condensação da cromatina (BELLETTI, COSTA E GUARDIEIRO, 2005), utiliza um corante catiônico com pH ácido (4,0) que tem a particularidade de ser metacromático e de interagir com os fosfatos ionizados da molécula de DNA (MELLO, 1982). Em condições normais, quando a protaminação é adequada, o íon fosfato fica bloqueado pela presença das protaminas e assim não fica exposto ao corante azul de toluidina, resultando em pouca união com o DNA e apresentando tons mais claros de azul. Contrariamente, em espermatozoides que apresentam cromatina menos compactada, há mais lugares de interação entre o corante e os fosfatos, resultando em tonalidade de azul mais intenso. Adicionalmente, a sensibilidade deste método de avaliação pode ser aumentada através da hidrólise ácida realizada antes da adição do corante (BELLETTI, COSTA E VIANA, 2004; BELLETTI, COSTA E GUARDIEIRO, 2005).

Utilizando a avaliação de DNA pelo azul de toluidina, informações relevantes foram associadas com a heterogeneidade e descompactação da cromatina de touros com diferentes graus de fertilidade. Adicionalmente, indivíduos submetidos à insolação testicular apresentaram maior porcentagem de alteração nos dois parâmetros (SOUZA *et al*, 2018).

Além da avaliação da integridade da cromatina nas células (porcentagem de descondensação e heterogeneidade cromatínica), o teste do azul de toluidina permite avaliar diferentes características morfométricas da cabeça dos espermatozoides. Através da coloração da cromatina e de um sistema computacional de análise de imagem ligado a um microscópio de luz, as imagens obtidas são posteriormente processadas e avaliadas usando algoritmos matemáticos no ambiente *MATLAB (MATrix LABoratory)* (BELLETTI, COSTA E VIANA, 2004; SOUZA *et al*, 2018). A avaliação morfométrica fornece as dimensões básicas da cabeça espermática, como o comprimento, largura, área e perímetro e as características derivadas destas medidas, como a relação comprimento: largura, elipticidade, fator de forma e simetria da cabeça, que proporcionam informação sobre o tamanho e morfometria celular (SOUZA *et al*, 2015; KIPPER *et al*, 2017, MARTINS *et al*, 2021).

Além de todas as características mensuradas pelo teste de azul de toluidina acima mencionadas, existe uma análise matemática multivariável que avalia a forma e a curvatura do núcleo espermático pelas amplitudes harmônicas de Fourier. Esta análise permite avaliar mudanças mais sutis da forma da cabeça do espermatozoide, que podem afetar a hidrodinâmica; e que pode diferenciar touros de diferente qualidade seminal (OSTERMIER *et al*, 2001; OSTERMIER *et al*, 2001b).

Assim, a integridade de DNA está correlacionada significativamente com a porcentagem de espermatozoides normais, principalmente no que diz respeito ao formato da cabeça espermática. Isso significa que um alto número de anormalidades celulares pode estar diretamente relacionado a um aumento na probabilidade de presença de danos no DNA, ou vice-versa, afetando assim a fertilidade dos reprodutores. Entretanto, os parâmetros fornecidos pelo teste de azul de toluidina e o sistema computacional integrado (BELETTI, COSTA E VIANA, 2004, SOUZA *et al*, 2018) também conseguiu concluir que os achados relacionados com a descompactação da cromatina não estão totalmente associados com alterações morfológicas da cabeça do espermatozoide (BELETTI, COSTA E GUARDEIRO, 2005), de modo que espermatozoides com morfologia normal também podem apresentar alterações cromatínicas.

Quando foi comparado com outras avaliações de integridade do DNA, o teste de azul de toluidina proporcionou informação semelhante e relevante associada com a heterogeneidade e descompactação de touros com diferentes graus de fertilidade (SOUZA *et al*, 2018). O teste de azul de toluidina permitiu ainda identificar que células viáveis e maduras devem atingir alto nível de compactação de DNA e baixa heterogeneidade na sua estrutura cromatínica (MARTINS *et al*, 2021). Além disso, tal avaliação permitiu demonstrar que os espermatozoides normais apresentam maior comprimento e elipticidade na cabeça espermática (KIPPER *et al*, 2017; MARTINS *et al*, 2021) o que também está associado com alta compactação cromatínica. Cabe ainda destacar que altas porcentagens de defeitos de DNA na amostra afetam a fertilidade e dificilmente conseguem ser eficientemente compensadas aumentando-se o número de espermatozoides na palheta de sêmen (NAGY *et al*, 2013; SIMON e LEWIS, 2011, PERRY, 2021).

3. HIPÓTESE

A mimetização das condições ambientais do trato reprodutivo da fêmea bovina (como a incubação térmica e a baixa concentração de oxigênio), com previa seleção espermática através de gradiente de densidade e adição de heparina, pode detectar diferenças na resistência *in vitro* de amostras de sêmen de reprodutores bovinos que apresente relação mais assertiva com a fertilidade a campo, por se tratar de um ambiente laboratorial mais condizente com alguns dos desafios que os espermatozoides têm que superar *in vivo* no TRF após a inseminação artificial (comparado com a tradicional avaliação pós-descongelamento).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Desenvolver um novo método de análise seminal *in vitro* que mimetiza condições do trato reprodutor das vacas após a inseminação artificial (o qual será aqui denominado “desafio laboratorial”) e avaliar diferenças na resistência *in vitro* de amostras de sêmen descongelado de diferentes touros depois de serem submetidas ao desafio laboratorial aqui proposto, a fim de comparar os resultados laboratoriais com a fertilidade a campo dos touros avaliados

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar diferentes características espermáticas *in vitro* do sêmen descongelado de diferentes touros antes e depois do desafio laboratorial.
- Identificar as principais características seminais *in vitro* relacionadas com a fertilidade *in vivo* dos diferentes touros avaliados.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local e período

O presente experimento laboratorial foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da UFMG (Belo Horizonte, MG) entre os anos de 2020 e 2021. Foram utilizadas doses de sêmen congelado de 6 touros Angus, oriundos de central registrada para processamento e comercialização de sêmen (central de Inseminação Artificial).

Foram utilizadas doses de touros que já possuíam resultados de fertilidade a campo após inseminação artificial em um programa de IATF. Os dados de campo das partidas de sêmen do experimento se referem a dados registrados na estação de monta de ano anterior ao experimento, oriundos e fornecidos por uma fazenda comercial de gado de corte.

Este projeto tem aprovação da comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo CEUA 36/2018).

5.2. Dados de Campo

Estes dados são referentes a taxa de concepção após primeiro serviço de Inseminação Artificial em tempo fixo (IATF) de vacas nelore multíparas locadas em fazenda comercial de gado de corte (n: 890 vacas), localizada no município de Nova Xavantina, Mato Grosso (Agropecuária Fazenda Brasil; 15° 2' 03" S e 52° 19' 2" W).

Nesta fazenda todos os animais foram separados por lotes de aproximadamente 100 a 120 animais e mantidos em pasto composto por *Brachiaria brizantha* ou *Brachiaria decumbens*, suplementados com sal mineral e livre acesso à água. As vacas utilizadas apresentavam idade entre 5 e 8 anos e ECC entre 2,0 e 3,5, em uma escala de 1 a 5 (onde 1 = muito magra e 5 = obesa) e todas foram submetidas ao protocolo reprodutivo de IATF rotineiro da fazenda na ocasião da respectiva estação de monta, como evidencia-se na figura 1.

Para primeiro serviço, todas as vacas receberam o mesmo protocolo de IATF começando 30 a 40 dias pós-parto. O protocolo de IATF (Figura 1) se iniciou (dia 0) com as vacas recebendo um dispositivo intravaginal liberador de P4 (1,9 g, CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brasil) e uma injeção intramuscular (i.m.) de 2,0 mg de Benzoato de Estradiol (BE; Gonadiol®, Zoetis, São Paulo, Brasil). O dispositivo de P4 foi removido no dia 9, quando os animais receberam injeções de 0,5 mg i.m. de Cipionato de Estradiol (ECP®, Zoetis, São Paulo, Brasil),

12,5 mg de Dinoprost trometamina i.m. (PGF2 α , Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil) e 300 IU de eCG i.m. (Novormon 5000®; Zoetis, São Paulo, Brasil).

Dois dias após remoção do dispositivo (dia 11), as vacas foram inseminadas (IATF) por três inseminadores experientes e os dados da taxa de prenhez aos 30 dias da inseminação foram fornecidos pela fazenda.

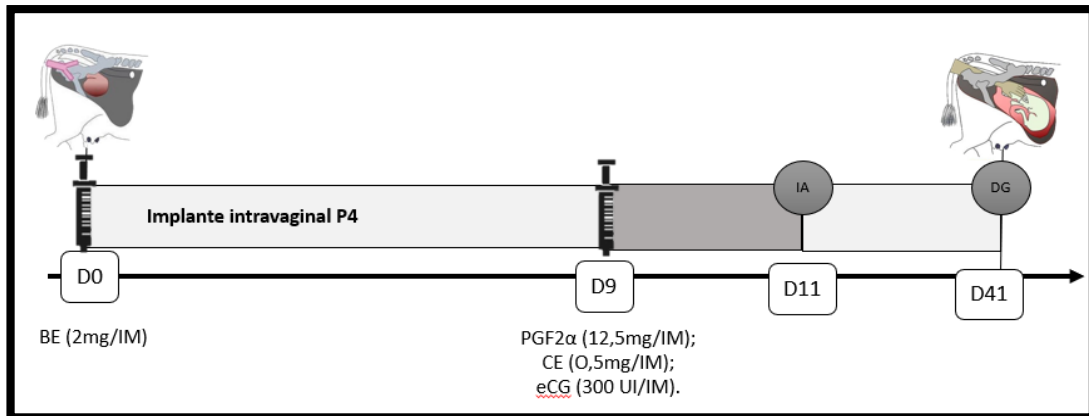


Figura 1. Esquema do protocolo de IATF utilizado a campo: P4: progesterona; BE: Benzoato de estradiol; eCG: Gonadotrofina coriônica equina; PGF2 α : prostaglandina F2 α ; CE: Cipionato de estradiol; D0: dia 0 do protocolo hormonal; D9: dia 9 do protocolo; D11: dia 11 do protocolo; D41: Dia 41 do protocolo; IA: Inseminação artificial; DG: Diagnóstico de gestação.

5.3. Delineamento Experimental

Foram utilizadas doses de sêmen congelado de 6 touros diferentes, sendo 1 partida de cada touro. Foram realizadas 3 repetições deste desenho experimental, para cada partida (n=18). Para cada dose de sêmen, o seguinte procedimento foi realizado (Figura 2):

Etapa 1: inicialmente, a palheta de sêmen (500 μ L) foi descongelada à 37°C por 30 segundos (Grupo controle) e o seguinte procedimento foi realizado: uma alíquota de 20 μ L foi utilizada para avaliação de motilidade e vigor espermático, uma alíquota de 20 μ L para avaliação da patologia espermática e uma alíquota de 10 μ L para avaliação da concentração espermática, todos por microscopia de contraste de fase. Adicionalmente uma alíquota de 25 μ L foi utilizada para realização do teste hiposmótico por microscopia de contraste de fase, uma alíquota de 6 μ L foi utilizada para realização da análise computadorizada do sêmen (CASA) e uma alíquota de 30 μ L foi utilizada para confecção de esfregaço para posterior realização da análise de compactação e heterogeneidade de DNA, e morfometria espermática, pela coloração com azul de

toluidina (Descrição detalhada de cada avaliação no item: 5.4. *Análise seminal do sêmen bovino*).

Etapa 2: uma alíquota de 200 μL da amostra recém-descongelada foi colocada em um microtubo e imediatamente centrifugada a 410xg (equivalente a 1610 rpm), em gradiente de Percoll® (Cytiva 17-0891-02 GE Sigma Chemical, Chicago EUA) 45/90% (250 μL do gradiente composto por 45% de Percoll® e 250 μL do gradiente composto por 90% de Percoll®), por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, da amostra centrifugada retirou-se o sobrenadante e ao pellet formado (200 μL) adicionou-se o meio TALP sêmen (*Tyrode's albumin lactate pyruvate*) (LIMA, 2018) para ajustar a concentração para 5×10^6 spz/mL. Deste volume final, transferiu-se 200 μL para um microtubo (1×10^6 spz) e, posteriormente, adicionou-se 2 μL (0,16 μg) de Heparina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Hepamax-S, Blau Farmacêutica, Cotia, Brasil). Essa amostra foi então incubada a 38,5°C por 2h, em estufa (MiDi 40 series, Thermo Fisher Scientific, Asheville, EUA) com atmosfera controlada com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ e umidade saturada. Após 2h de incubação, os mesmos testes laboratoriais citados na etapa 1 foram realizados. Essas análises realizadas após o desafio laboratorial aqui proposto serão referentes do Grupo desafio *in vitro* (Grupo pós desafio).

Etapa 3: avaliação e comparação das características espermáticas evidenciadas nos testes laboratoriais, antes e depois do desafio laboratorial, determinando a relação destes com a fertilidade do sêmen a campo.

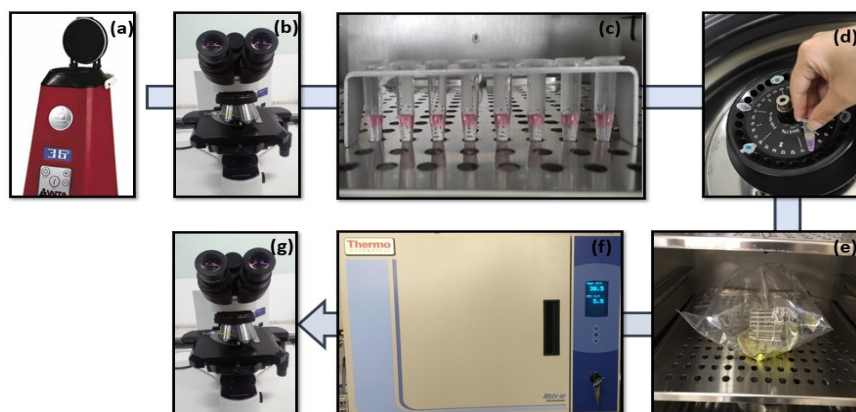


Figura 2. Diagrama de fluxo do delineamento experimental: (b): Descongelamento a 37 °C por 30 segundos; (b): Avaliação espermática (grupo controle); (c): Preparação e montagem do gradiente descontínuo de Percoll (45%-90%); (d): Centrifugação do sêmen com o Percoll, 410g x 10 min, temperatura ambiente; (e): Mistura de gases em saquinho plástico. 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂; (f): Incubação por 2 horas e, estufa com atmosfera controlada; (g): Avaliação espermática pós desafio.

5.4. *Análise seminal do sêmen bovino*

5.4.1. *Análise convencional de sêmen*

A avaliação convencional da motilidade, vigor, morfologia e concentração espermática será realizada sob microscopia de contraste de fase (Nikon Eclipse E200, Nikon Instruments Inc, Melville, EUA). A avaliação visual da motilidade e vigor foi aferida em aumento 100X. A concentração espermática foi determinada com o emprego da câmara de Neubauer, com aumento de 400X. A morfologia espermática foi realizada por fixação e preparação úmida em formol salina (SODERQUIST *et al*, 1991) e avaliada com aumento de 1000X, contando-se 200 espermatozoides e anotando-se as alterações morfológicas observadas e sendo classificadas em defeitos maiores e menores, como foi descrito por Blom (1973), em função do efeito que teria cada defeito sobre a fertilidade.

5.4.2. *Análise computadorizada da cinética espermática*

A motilidade espermática foi analisada pelo sistema CASA (Sperm Class Analyzer v.4.0.0, Microptic, Barcelona, Espanha) pré-ajustado para a configuração “BOVINO” a uma temperatura de 37°C, as configurações da análise são apresentadas no apêndice.

Para realização da análise, 6 µL do sêmen foi depositado em lâmina de leitura padrão (Makler counting chamber, SEFI Medical Instruments LTD, Haifa, Israel) previamente aquecida a 37°C, a qual foi inserida no aparelho. Seis campos foram aleatoriamente selecionados para cada amostra. As variáveis da cinética espermática analisadas pelo CASA foram: Motilidade Total (MT; %), Motilidade Progressiva (PM; %), Velocidade de Trajeto (VAP; µm/s), Velocidade Progressiva (VSL; µm/s), Velocidade Curvilínea (VCL; µm/s), Amplitude Lateral da Cabeça (ALH; µm), Freqüência de Batimentos (BCF; Hz), Retilinearidade (STR; %), Linearidade (LIN; %) e Células com Velocidade Rápida (RAPID; %).

5.4.3. *Integridade de membrana – Teste hiposmótico*

O teste hiposmótico foi realizado de acordo com o método descrito por Lomeo e Giambersio (1991), utilizando-se água destilada (0 mOsm/Kg) como solução hiposmótica e uma proporção de 25µl de sêmen com 50µl de água (1:2) para posteriormente ser incubado durante 5 minutos a 37°C como indicado por Vasconcelos e colaboradores (2010). Após esse período, foi

realizada a contagem de 200 espermatozoides, em microscopia de contraste de fase, em aumento de 400X.

O resultado foi determinado em porcentagem, sendo o cálculo realizado pela seguinte fórmula: HIPO (%) = (% de alterações na região da cauda após teste HIPO) – (% de alterações na região da cauda dos espermatozoides antes do teste HIPO) (CORREA, HEERSCHÉ e ZAVOS, 1997).



Figura 3. Sistema CASA: microscópio óptico com câmara acoplada e câmara de Makler

5.4.4. Integridade de DNA - Teste de azul de toluidina

Esfregaços das amostras de sêmen foram realizados e posteriormente foram fixados em uma solução de etanol: ácido acético (3:1) por 1 minuto e posteriormente em etanol 70% por 3 minutos. As lâminas com o esfregaço foram secadas a temperatura ambiente. Posteriormente cada esfregaço é submetido à hidrólise ácida (4N ácido clorídrico) por 25 minutos, lavados em água destilada e secado a temperatura ambiente. Com a lâmina seca coloca-se uma gota de azul de toluidina a 0,025% (peso/ volume) (Azul de Toluidina PA, Synth, São Paulo, Brasil) preparada em pH 4,0 em um tampão de citrato – fosfato sódico, e então esta é coberta com uma lamínula. Depois de 3 minutos, as imagens foram obtidas usando um microscópio óptico de luz na magnificação de 1000x (Leica DM500, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), com uma câmara acoplada (Leica ICC50, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e um sistema de captura de imagem (Leica LAS EZ software version 1,8,1) (SOUZA *et al*, 2018).

Imagens digitais de mais de 200 espermatozoides foram obtidas para cada amostra, e submetidas a segmentação da cabeça espermática através de derivadas de segundo ordem para

ser avaliada pelo ambiente MATILAB. Subsequentemente, foi feita uma imagem binária da cabeça de cada espermatozoide e foi determinado o nível de pixels de cada imagem; uma técnica de morfologia matemática (*Erosion Operation*) foi usada para descartar os pixels ao redor do perímetro da cabeça. No MATILAB é avaliada a intensidade média de cada pixel que compõe a cabeça para ser transformada a uma escala de cinzas. A intensidade média dos pixels das 20 cabeças espermáticas mais homogêneas e compactas de cada amostra é calculada como valor de referência. Assim, a diferença entre o valor padrão da amostra e a média dos valores de pixel de cada cabeça analisada é transformada em porcentagem (Dif%), indicando o percentual de espermatozoides com cromatina considerada descompactada na amostra. Adicionalmente, calcula-se o coeficiente de variação (CV) da intensidade de tons de cinza de cada cabeça, o qual representa quantitativamente a heterogeneidade da compactação da cromatina na cabeça espermática (BELETTI *et al.*, 2005; 2005b; SOUZA *et al.*, 2018). Ainda nesta técnica, a área, o perímetro, a largura, o comprimento, a relação comprimento: largura, a elipticidade e o fator forma de todas as cabeças são também determinados por cálculos matemáticos, realizados com algoritmos desenvolvidos em ambiente MATILAB. Da mesma forma, a simetria lateral e a simetria anteroposterior da cabeça espermática são mensuradas para identificação de assimetrias ao longo dos eixos principais do espermatozoide (BELETTI *et al.*, 2005; 2005b).

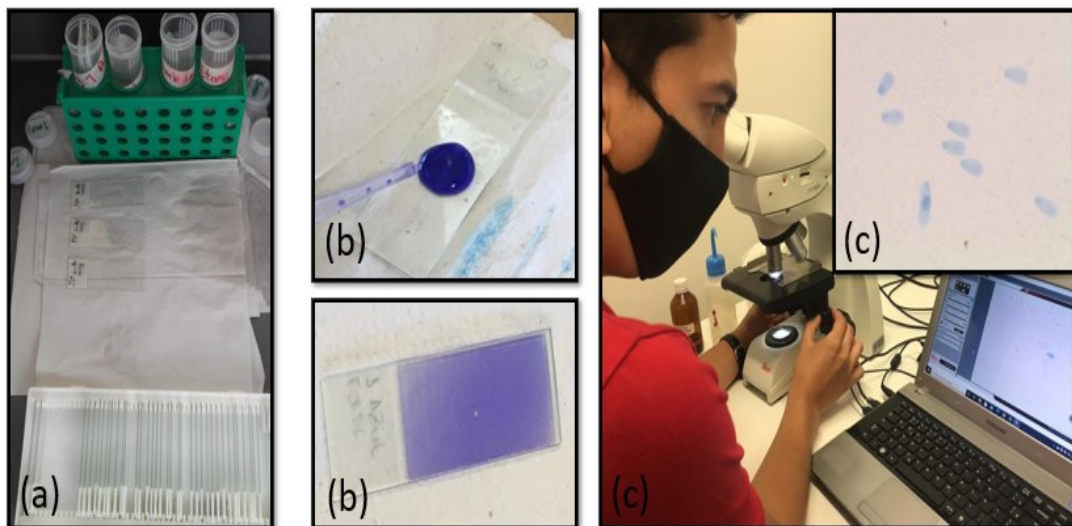


Figura 4: Teste de azul de toluidina: (a): Fixação do esfregaço em etanol 70%: ácido acético puro (1 minuto) e etanol 70% (3 minutos); (b): Tintção do esfregaço com azul de toluidina (pH 4,0); (c): Captura de imagens em microscópio óptico de luz com câmera e software acoplado.

5.5. Análises estatísticas

5.5.1 Análise estatística – parte a campo

Para avaliar o efeito das variáveis preditoras na taxa de concepção das vacas, foi usado um modelo linear generalizado com distribuição binomial (Regressão logística) que é apropriado para respostas dicotômicas (gestação positiva ou negativa). Foram considerados como efeitos fixos o escore de condição corporal (ECC), touro, lote, inseminadores e suas interações. Foi realizado o método de seleção backward, onde fatores individuais não significativos foram continuamente removidos até se chegar a um modelo mais parcimonioso com todas as variáveis significativas.

O valor de significância das variáveis preditores foi acessada através de um teste de análise de variância e variáveis com mais de dois níveis foram avaliadas através de teste de comparação múltiplas usando o teste de Tukey.

Em todos os testes foi contemplado um nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

5.5.2 Análise estatística – parte laboratorial

Os resultados das análises seminais de cada amostra de sêmen e suas réplicas foram testados por análise de variância (ANOVA) quando cumpriam as premissas de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Teste de Bartlett) dos resíduos, para então serem submetidas a comparação de médias pelo teste de Tukey. As variáveis que não satisfaziam as premissas prévias para uso da ANOVA foram submetidas a transformações matemáticas (logarítmica, quadrática ou arco seno). Quando os resultados da variável não conseguiam ser ajustados, o método de avaliação foi não paramétrico, usando o teste de Kruskal-Wallis.

O valor de significância estatística foi estipulado em um valor de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

6. RESULTADOS

6.1. Fertilidade a campo

Os valores da seleção backward para fatores individuais durante o modelo linear generalizado se encontram na Tabela 1.

A taxa de concepção geral foi 48,95% (n = 890 vacas) e os dados descritivos de cada touro se encontram na Tabela 2.

A regressão logística desenvolvida mostrou através do método backward quais são os fatores que individualmente apresentaram maior relação com a taxa de concepção das vacas (Tabela 1). Mediante análise de variância complementar, verifica-se que, a campo, os touros representaram o fator preditivo mais importante (P = 0,007) no modelo geral da taxa de concepção das vacas aos 30 dias após inseminação. Não foi observada significância do escore de condição corporal (P = 0,459), inseminador (P = 0,562) ou lote de fêmeas (P = 0,398), nem das interações entre os diferentes fatores (P > 0,05).

Tabela 1. Método de seleção backward para fatores individuais durante o modelo linear generalizado.

Fator	Desvio padrão	Valor z	p valor
Intercepto	0,07	-0,474	0,636
Touro1: ECC 2,5	0,28	2,469	0,014
Lote 3: ECC 3,0	0,51	2,576	0,010
Touro 3: ECC 3,5	0,39	-2,376	0,017

Tabela 2. Taxa de concepção após inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de vacas múltíparas da raça Nelore (40 a 50 dias pós-parto), de acordo com o touro.

Touro	Taxa de Concepção	N
1	42,6% a	162
2	40,3% a	119
3	52,3% ab	174
4	44,6% ab	139
5	53,0% ab	168
6	60,9% b	128
Total	48,95%	890

a,b: letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam P<0,05.

6.2. Avaliação do grupo controle – pós descongelação

Os resultados da avaliação seminal convencional após a descongelação (grupo controle) são exibidos na Tabela 3, onde nota-se diferença significativa em vários dos parâmetros avaliados. Porém, nos touros em que foram observadas diferenças na taxa de concepção (touros 1, 2 e 6), destaca-se o parâmetro HOST, onde o touro 1 (menor fertilidade a campo em relação ao touro 6) demonstrou maior ($P = 0.005$) porcentagem de integridade de membrana após o congelamento do que o touro 6.

Tabela 3. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros da análise convencional de sêmen depois da descongelação (grupo controle).

T	MV (%)	Vig (1-5)	HOST (%)	Conc ($\times 10^6$)	Mov x Dose ($\times 10^6$)	DMA (%)	Dme (%)	Dtot (%)
1	46,3 \pm 4,8 ab	3,0 \pm 0,1 ab	44,4 \pm 4,5 a	37,6 \pm 7,9	9,3 \pm 2,6 ab	3,9 \pm 0,3 ab	10,8 \pm 5,2	14,6 \pm 5,0 ab
2	50,0 \pm 17,3ab	3,0 \pm 0,1 ab	41,7 \pm 8,8 ab	36,9 \pm 7,9	12,6 \pm 2,0 ab	4,0 \pm 1,0 ab	7,3 \pm 2,5	11,3 \pm 3,2 b
3	65,0 \pm 5,0 a	3,3 \pm 0,6 a	52,0 \pm 2,0 a	25,5 \pm 3,5	9,3 \pm 2,4 ab	2,0 \pm 0,5 b	11,0 \pm 1,0	13,0 \pm 0,5 b
4	53,8 \pm 7,5 ab	3,0 \pm 0,1 ab	37,6 \pm 2,1 ab	32,5 \pm 8,2	7,8 \pm 2,8 b	6,9 \pm 2,1 a	13,3 \pm 2,0	20,1 \pm 0,3 a
5	34,0 \pm 1,0 ab	3,0 \pm 0,1 ab	34,0 \pm 1,0 ab	35,2 \pm 0,9	9,7 \pm 0,4 ab	3,2 \pm 0,8 b	11,0 \pm 1,0	14,2 \pm 1,4 ab
6	40,0 \pm 5,0 b	2,0 \pm 0,1 b	23,5 \pm 5,7 b	36,3 \pm 5,5	9,6 \pm 2,5 ab	2,2 \pm 1,0 b	11,7 \pm 1,5	13,8 \pm 0,8 ab

T: touro; MV%: Motilidade visual; Vig: Vigor na escala de 1 a 5; HOST%: Integridade de membrana avaliada pelo teste hiposmótico; Conc($\times 10^6$): Concentração espermática; Mov x Dose($\times 10^6$): total de espermatozoides móveis na palheta; DMA%: Defeitos maiores de morfologia espermática; Dme%: Defeitos menores de morfologia espermática; Dtot: Defeito totais da morfologia espermática. a,b: letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam $P < 0,05$.

Os resultados da avaliação seminal pelo sistema CASA após a descongelação (grupo controle) são exibidos na tabela 4. Nota-se que não houve diferença entres os touros de importância (1, 2 e 6) para os parâmetros cinéticos fornecidos pelo sistema CASA.

Tabela 4. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros da avaliação pelo CASA de sêmen depois da descongelação (grupo controle).

T	MT (%)	MP (%)	Rap (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	BCF (Hz)	ALH (μm)
1	53,8 \pm 13,4	28,2 \pm 5,5	26,6 \pm 7,4	34,2 \pm 1,4	52,6 \pm 2,15	27,8 \pm 1,3	53,1 \pm 2,9	81,5 \pm 2,6	10,3 \pm 0,2	2,58 \pm 0,1 b
2	69,7 \pm 14,2	38,1 \pm 11,3	39,7 \pm 13,8	38,7 \pm 4,9	59,0 \pm 6,36	31,5 \pm 4,2	53,4 \pm 1,4	81,4 \pm 1,0	10,6 \pm 0,6	2,9 \pm 0,2 ab
3	72,5 \pm 8,74	40,4 \pm 6,6	40,2 \pm 3,5	36,6 \pm 1,9	59,7 \pm 1,91	29,6 \pm 2,4	49,6 \pm 3,6	81,0 \pm 2,3	10,7 \pm 0,2	2,93 \pm 0,2 ab
4	47,9 \pm 11,6	24,6 \pm 8,9	25,6 \pm 8,5	34,6 \pm 2,9	54,3 \pm 4,85	28,2 \pm 2,7	51,9 \pm 2,0	81,5 \pm 1,1	10,3 \pm 0,4	2,95 \pm 0,13 a
5	54,9 \pm 0,9	24,6 \pm 3,1	26,4 \pm 2,8	29,7 \pm 1,2	50,7 \pm 2,5	22,8 \pm 2,1	45,2 \pm 4,7	76,8 \pm 3,9	10,1 \pm 0,1	2,83 \pm 0,2ab
6	53,8 \pm 17,7	28,2 \pm 12,9	27,9 \pm 13,5	33,0 \pm 6,2	52,4 \pm 6,9	26,5 \pm 6,2	50,3 \pm 4,9	79,9 \pm 3,5	10,3 \pm 0,5	2,87 \pm 0,1 ab

T: Touro; MT%: Motilidade visual; MP%: Motilidade progressiva; Rap%: Porcentagem de células rápidas; VAP ($\mu\text{m/s}$): Velocidade média da trajetória; VCL ($\mu\text{m/s}$): Velocidade curvilínea; VSL ($\mu\text{m/s}$): Velocidade linear progressiva; LIN (%): Linearidade; STR (%): Retilinearidade; BCF (Hz): Frequência de batimento flagelar; ALH (μm): Amplitude de deslocamento lateral da cabeça. a,b: letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam $P < 0,05$.

Com relação aos resultados dos parâmetros morfométricos do teste de azul de toluidina após a descongelamento (grupo controle), encontraram-se diferenças no fator de forma ($P = 0,0001$), simetria antero-posterior ($P = 0,0025$) e no valor do Fourier 1 ($P = 0,0141$) entre o touro 1 e o touro 6, como evidenciado na tabela 5. No entanto, não foram encontradas diferenças entre os touros, relacionados com o grau de compactação e heterogeneidade da cromatina no grupo controle, conforme demonstrado na tabela 6.

Tabela 5. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros morfométricos do teste de azul de toluidina do sêmen pós-descongelamento (grupo controle)

T	Area (μm^2)	Peri (μm)	Larg (μm)	Comp (μm)	L/C	Elips	SAP	FF	F0	F1	F2
1	8,93 \pm 0,229	9,78 \pm 0,098	1,94 \pm 0,033	3,75 \pm 0,031	0,516 \pm 0,005 ab	0,320 \pm 0,005ab	0,880 \pm 0,002b	0,910 \pm 0,001 a	842,08 \pm 8,133	144,02 \pm 6,539a	71,13 \pm 3,001
2	8,46 \pm 0,374	9,43 \pm 0,263	1,87 \pm 0,043	3,62 \pm 0,117	0,518 \pm 0,013 ab	0,318 \pm 0,011ab	0,908 \pm 0,010a	0,896 \pm 0,005 b	762,96 \pm 62,096	112,78 \pm 17,813ab	71,93 \pm 4,893
3	8,46 \pm 0,374	9,61 \pm 0,232	1,89 \pm 0,058	3,72 \pm 0,082	0,507 \pm 0,006 b	0,327 \pm 0,006a	0,909 \pm 0,007a	0,887 \pm 0,004 c	810,14 \pm 29,840	115,84 \pm 7,637 ab	74,57 \pm 6,504
4	8,94 \pm 0,619	9,73 \pm 0,275	1,89 \pm 0,078	3,74 \pm 0,094	0,505 \pm 0,009 b	0,329 \pm 0,008a	0,917 \pm 0,004a	0,888 \pm 0,001bc	832,62 \pm 34,211	108,58 \pm 4,326 b	73,48 \pm 9,369
5	8,43 \pm 0,923	9,29 \pm 0,525	1,90 \pm 0,105	3,55 \pm 0,209	0,536 \pm 0,013 a	0,303 \pm 0,011 b	0,916 \pm 0,008a	0,893 \pm 0,001 bc	710,67 \pm 89,167	101,74 \pm 18,082 b	74,71 \pm 9,023
6	8,51 \pm 0,334	9,49 \pm 0,200	1,86 \pm 0,040	3,67 \pm 0,082	0,508 \pm 0,009 b	0,327 \pm 0,008a	0,908 \pm 0,004a	0,889 \pm 0,003 bc	790,68 \pm 42,781	110,39 \pm 9,206 b	70,83 \pm 3,865

T: touro; Area; Peri: perímetro; Larg: largura; Comp: comprimento; L/C: ratio largura/comprimento; Elips: elipticidade; SAP: simetria antero - posterior; FF: fator de forma; F0: Fourier 0; F1: Fourier 1; F2: Fourier 2. a,b: letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam $P < 0,05$.

Tabela 6. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros de integridade da cromatina do teste de azul de toluidina do sêmen depois da descongelamento (grupo controle).

Touro	Descompactação (%)	Heterogeneidade (%)
1	5,97 \pm 2,057	3,83 \pm 0,271
2	5,09 \pm 1,436	3,62 \pm 0,266
3	5,64 \pm 0,591	3,96 \pm 0,821
4	4,72 \pm 1,846	3,35 \pm 0,632
5	5,08 \pm 1,006	3,75 \pm 0,646
6	5,51 \pm 0,913	3,61 \pm 0,174

Descompactação%: Porcentagem de diferença da média da escala de cinzas; Heterogeneidade%: Coeficiente de variação da intensidade da escala de cinzas.

6.3. Avaliação do grupo desafio – pós desafio

Na avaliação convencional após o desafio laboratorial, foram observadas diferenças estatísticas na motilidade visual ($P = 0,0002$), vigor ($P = 0,0005$) e nos defeitos maiores ($P = 0,0017$) entre os animais 1, 2 e 6, touros em foco no estudo (Tabela 7). Com relação à integridade de membrana, não foram evidenciadas diferenças estatísticas entre os touros 1, 2 e 6.

Tabela 7. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros da análise convencional de sêmen após desafio laboratorial (grupo desafio).

T	MV (%)	Vig (1-5)	Host (%)	Conc ($\times 10^6$)	Mov x Dose	DMA (%)	Dme (%)	Dtot (%)
1	16,5 \pm 13,4c	1,9 \pm 0,6b	19,1 \pm 17,2ab	3,9 \pm 2,7	0,5 \pm 0,4	1,8 \pm 0,5a	43,0 \pm 10,0a	44,8 \pm 10,2a
2	21,7 \pm 2,9bc	2,5 \pm 0,5ab	23,3 \pm 5,3ab	3,9 \pm 3,9	0,6 \pm 0,7	1,7 \pm 0,6a	24,7 \pm 11,6ab	26,4 \pm 11,8ab
3	36,7 \pm 5,8ab	3,5 \pm 0,5a	34,8 \pm 5,1a	5,2 \pm 5,0	0,8 \pm 0,7	1,7 \pm 0,6a	16,7 \pm 11,6ab	18,4 \pm 11,8ab
4	7,5 \pm 5,0c	1,9 \pm 0,6b	8,0 \pm 3,9b	5,9 \pm 2,4	0,7 \pm 0,4	0,5 \pm 0,6b	4,3 \pm 6,5b	4,8 \pm 6,2b
5	36,7 \pm 5,8ab	3,2 \pm 0,3a	34,3 \pm 4,8a	4,6 \pm 1,6	0,7 \pm 0,4	0,7 \pm 0,6b	8,7 \pm 11,6ab	9,4 \pm 11,8ab
6	43,3 \pm 7,6a	3,8 \pm 0,3a	37,5 \pm 11,7a	9,8 \pm 2,8	1,2 \pm 0,5	0,7 \pm 0,6b	12,7 \pm 11,6ab	13,4 \pm 11,8ab

T: touro; MV%: Motilidade visual; Vig: Vigor na escala de 1 a 5; Host%: Integridade de membrana avaliada pelo teste hiposmótico; Conc($\times 10^6$): Concentração espermática; Mov x Dose($\times 10^6$): total de espermatozoides moveis na palheta; DMA%: Defeitos maiores; Dme%: Defeitos menores; Dtot: Defeitos totais. a,b: letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam $P < 0,05$.

Nos resultados da avaliação pelo sistema CASA, observou-se diferenças estatísticas entre touros 4 e 5 na motilidade total e progressiva, porém, não foram observadas diferenças entre os touros mais relevantes do presente estudo (touros 1, 2 e 6).

Tabela 8. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros da avaliação pelo CASA de sêmen após desafio laboratorial (grupo desafio).

T	MT (%)	MP (%)	Rap (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	BCF (Hz)	ALH (μm)
1	16,7 \pm 14,9ab	12,5 \pm 13,13ab	11,1 \pm 10,62	45,8 \pm 7,87	50,5 \pm 6,57	43,4 \pm 7,49	85,7 \pm 3,75	94,7 \pm 0,37	7,6 \pm 1,03	1,55 \pm 0,25
2	23,4 \pm 8,8ab	12,8 \pm 7,09ab	12,4 \pm 10,28	41,2 \pm 19,69	46,9 \pm 17,31	38,4 \pm 19,69	79,0 \pm 14,22	79,0 \pm 14,22	6,6 \pm 1,9	1,50 \pm 0,40
3	23,1 \pm 2,5ab	15,5 \pm 0,91ab	9,9 \pm 6,24	41,9 \pm 18,84	47,8 \pm 17,63	38,8 \pm 18,81	77,8 \pm 13,68	90,9 \pm 5,37	6,10 \pm 3,14	2,37 \pm 2,11
4	10,0 \pm 2,9b	5,5 \pm 5,11b	3,78 \pm 2,61	35,7 \pm 19,80	43,8 \pm 16,33	31,7 \pm 21,59	66,1 \pm 23,54	83,5 \pm 14,47	4,78 \pm 2,13	1,25 \pm 0,24
5	32,2 \pm 6,8a	21,9 \pm 7,36a	16,6 \pm 6,60	54,6 \pm 6,98	59,0 \pm 7,78	51,2 \pm 7,84	86,7 \pm 5,96	93,5 \pm 3,35	8,13 \pm 0,91	1,53 \pm 0,12
6	30,0 \pm 5,1a	20,6 \pm 4,65ab	15,3 \pm 8,34	54,8 \pm 15,05	62,1 \pm 14,26	52,1 \pm 15,31	83,4 \pm 9,41	94,7 \pm 2,63	7,37 \pm 2,16	1,53 \pm 0,42

T: touro; MT%: Motilidade visual; MP%: Motilidade progressiva; Rap%: Porcentagem de células rápidas; VAP ($\mu\text{m/s}$): Velocidade média da trajetória; VCL ($\mu\text{m/s}$): Velocidade curvilínea; VSL ($\mu\text{m/s}$): Velocidade linear progressiva; LIN(%): Linearidade; STR(%): Retilinearidade; BCF(Hz): Frequência de batimento flagelar; ALH(μm): Amplitude de deslocamento lateral da cabeça. a,b: letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam $P < 0,05$.

Com relação aos parâmetros morfométricos da cabeça dos espermatozoides e de caracterização da compactação e heterogeneidade da cromatina fornecidos pelo teste de azul de toluidina após o desafio laboratorial, não foram encontradas diferenças importantes entre os touros de maior importância, conforme demonstrado nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros morfométricos do teste de azul de toluidina do sêmen após desafio laboratorial (grupo desafio)

T	Area (μm^2)	Peri (μm)	Larg (μm)	Comp (μm)	L/C	Elips	SAP	FF	F0	F1	F2
1	9,66 \pm 0,296ab	10,09 \pm 0,12 ab	2,02 \pm 0,04	3,85 \pm 0,04abc	0,526 \pm 0,01 b	0,311 \pm 0,001a	0,899 \pm 0,001 c	0,906 \pm 0,001 a	871,01 \pm 11,86 ab	141,10 \pm 1,640 a	78,85 \pm 5,74 b
2	9,32 \pm 0,56b	9,83 \pm 0,25 b	1,97 \pm 0,08	3,76 \pm 0,08 bc	0,523 \pm 0,01 b	0,314 \pm 0,01a	0,921 \pm 0,001a	0,889 \pm 0,002 b	813,03 \pm 22,72 ab	107,24 \pm 5,315 b	78,75 \pm 7,42b
3	9,99 \pm 0,01ab	10,19 \pm 0,01ab	2,04 \pm 0,001	3,92 \pm 0,002ab	0,519 \pm 0,001b	0,317 \pm 0,001a	0,914 \pm 0,00ab	0,887 \pm 0,001 b	880,68 \pm 1,08ab	122,70 \pm 0,271ab	89,83 \pm 1,27a
4	10,29 \pm 0,33a	10,35 \pm 0,16 a	2,06 \pm 0,05	3,95 \pm 0,06a	0,521 \pm 0,004 b	0,315 \pm 0,003a	0,922 \pm 0,003 a	0,889 \pm 0,003 b	903,63 \pm 19,20a	115,34 \pm 7,721 ab	85,01 \pm 0,95b
5	9,55 \pm 0,13ab	9,86 \pm 0,05 b	2,03 \pm 0,03	3,75 \pm 0,01c	0,542 \pm 0,01a	0,297 \pm 0,01b	0,919 \pm 0,00a	0,891 \pm 0,004 b	781,59 \pm 1,99 b	108,71 \pm 0,072 ab	79,06 \pm 1,52 b
6	9,52 \pm 0,46ab	9,98 \pm 0,25ab	1,98 \pm 0,06	3,84 \pm 0,10abc	0,516 \pm 0,002b	0,319 \pm 0,001a	0,906 \pm 0,01bc	0,890 \pm 0,003 b	852,09 \pm 35,46 ab	124,08 \pm 6,983 ab	83,06 \pm 3,16ab

T: touro; Area; Peri: perímetro; Larg: largura; Comp: comprimento; L/C: ratio largura/comprimento; Elips: elipticidade; SAP: simetria antero - posterior; FF: fator de forma; F0: Fourier 0; F1: Fourier 1; F2: Fourier 2. a,b: letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam $P < 0,05$.

Tabela 10. Média \pm desvio padrão das réplicas de cada um dos 6 touros para os parâmetros de integridade da cromatina do teste de azul de toluidina do sêmen após o desafio laboratorial (grupo desafio).

Touro	Descompactação (%)	Heterogeneidade (%)
1	3,18 \pm 0,75	3,66 \pm 0,67
2	4,23 \pm 1,12	3,66 \pm 1,04
3	4,14 \pm 0,12	4,65 \pm 0,08
4	5,01 \pm 1,19	4,21 \pm 0,98
5	5,08 \pm 0,66	4,01 \pm 0,38
6	5,91 \pm 2,95	3,79 \pm 0,29

Descompactação%: Porcentagem de diferença da média da escala de cinzas; Heterogeneidade%: Coeficiente de variação da intensidade da escala de cinzas.

7. DISCUSSÃO

A forma mais acurada de estimar a fertilidade do macho e/ou de cada partida de sêmen é pelo teste de fertilidade em campo, avaliado mediante inseminação de um número grande de fêmeas. Esse método, apesar de oneroso e pouco prático, é o único que permite diferenciar o real potencial fértil dos touros (ZHANG *et al.*, 1999), ainda atualmente. No presente estudo, o intuito foi desenvolver um método de teste laboratorial de resistência seminal (aqui denominado “desafio laboratorial”) que mimetiza condições do trato reprodutor feminino das vacas após a inseminação artificial, para ser realizado previamente à avaliação de características espermáticas *in vitro*, objetivando diferenciar a resistência das diferentes amostras seminais ao desafio laboratorial proposto e associar essa resistência com a fertilidade a campo dos touros.

Indiscutivelmente, a qualidade seminal dos touros utilizados em um programa de IATF é um fator de importante influência nas taxas de prenhez (SÁ FILHO *et al.*, 2009). Conforme demonstrado neste estudo, a taxa de fertilidade foi significativamente diferente entre alguns touros, como também já demonstrado em outros trabalhos a campo (JANUSKAUSKAS *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1999; WARD *et al.* 2001, ANDERSSON *et al.* 2004; SÁ FILHO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012; MOHANTY *et al.*, 2015).

Muitos fatores biológicos, ambientais e de manejo precisam estar associados para que sejam alcançados valores aceitáveis de fertilidade em um grupo de fêmeas no sistema produtivo de gado de corte (UTT, 2016). Em contraste ao encontrado em alguns trabalhos onde o ECC, o inseminador e/ou o lote das vacas (MENEGETTI *et al.*, 2009; SÁ-FILHO *et al.*, 2009; SÁ-FILHO *et al.*, 2013; DINIZ *et al.*, 2021) também interferiram na fertilidade, no presente estudo o efeito touro se representou como o principal fator de influência na taxa de concepção das fêmeas bovinas. A pouca interferência das outras variáveis a campo do presente trabalho se deve possivelmente à uniformidade no manejo das fêmeas, qualificação equiparada dos técnicos de inseminação e distribuição equilibrada dos touros e inseminadores em todos os lotes.

Testes de fertilização e análise seminal *in vitro* permitem identificar e/ou apontar, com variável nível de acurácia, o potencial fértil dos machos. Adicionalmente, testes e modelos estatísticos tentam prever a fertilidade *in vitro* dos touros, extrapolando essa informação com a fertilidade dos touros *in vivo* (SUDANO *et al.*, 2011). Aplicando modelo estatístico PLS (*Partial least Squares*), Oliveira *et al.* (2013) conseguiu identificar variáveis espermáticas *in vitro* indicadas como importantes na predição da fertilidade de touros a campo. De forma semelhante, Sellem *et al.* (2015) observou que a associação entre parâmetros seminais gerou um modelo preditivo do potencial fértil dos indivíduos.

Assim, entende-se que avaliar as características seminais das diferentes partidas de sêmen utilizadas em um ensaio a campo pode trazer diferentes informações com relação aos inúmeros fatores seminais envolvidos no processo reprodutivo (CORREA, PACE e ZAVOS, 1997; TARTAGLIONE & RITTA, 2004). Na avaliação espermática *in vitro* após descongelamento do presente estudo, não foi possível observar diferenças importantes entre os touros avaliados. Porém, na avaliação após desafio, foi possível observar, em algumas análises seminais *in vitro*, que os touros com maior fertilidade a campo resistiram melhor ao desafio laboratorial proposto.

É bem sabido que motilidade e vigor espermáticos têm fundamental importância durante o trânsito espermático no TRF e na capacidade de penetração e fertilização do ovócito (MUIÑO-BLANCO *et al.*, 2008; SIMON & LEWIS, 2011). Diversos estudos demonstraram a importância da motilidade espermática avaliada convencionalmente *in vitro*, como um fator determinante e indispensável para a fertilidade a campo (GIBSON & GRAHAM, 1969; BERNDTSON *et al.*, 1980; CORREA & ZAVOS, 1994). No entanto, em outros estudos, os resultados se demonstraram contraditórios, como descrito por Andersson e colaboradores (1992), onde a motilidade visual e automatizada não apresentaram uma correlação direta com a taxa de não retorno das vacas. No presente estudo, motilidade espermática e vigor avaliados visualmente após desafio laboratorial se apresentaram melhores no touro com melhor fertilidade a campo em comparação aos touros de menor fertilidade, o que não foi observado imediatamente após a descongelação das amostras seminais. Esses resultados indicam que o touro de maior fertilidade apresentou maior resistência ao desafio laboratorial aqui proposto do que os touros de menor fertilidade, nas características motilidade e vigor convencionalmente analisados. Assim, a realização do presente teste de resistência seminal (previamente a realização das análises seminais *in vitro*), pode ser considerada uma interessante alternativa na avaliação do sêmen de touros.

Características espermáticas fornecidas pelo sistema CASA proporcionam informação mais objetiva e com alto nível de acurácia da cinética das amostras seminais (FARREL *et al.*, 1998; VERSTEGEN *et al.*, 2002). A depender da população de animais utilizada (CORREA, PACE e ZAVOS, 1997; MUIÑO *et al.*, 2008), e/ou do delineamento experimental proposto (KUTCHY *et al.*, 2019), é possível comparar touros de alta e baixa fertilidade através do CASA. Januskauskas *et al.* (2001) demonstraram que parâmetros de motilidade fornecidos pelo CASA apresentam correlação com a motilidade avaliada subjetivamente (mesmo que exista uma diferença de dez pontos percentuais entre elas) e que ambas apresentam correlação moderada com a fertilidade.

No grupo controle do presente estudo não foram evidenciadas diferenças entre os touros nos dados fornecidos pelo sistema CASA, indicando que, imediatamente após a descongelamento do sêmen, todos os animais apresentavam parâmetros cinéticos similares na avaliação automatizada. Por outro lado, na avaliação após o desafio, foram encontradas diferenças entre alguns touros do estudo com relação à motilidade total e progressiva, indicando que alguns animais apresentaram maior resistência ao desafio laboratorial proposto do que outros. Entretanto, entre os animais de maior interesse do presente estudo (touros 1, 2 e 6) não foram evidenciadas diferenças significativas nesta análise. Neste sentido, embora alguns parâmetros já se demonstraram positivamente correlacionados com a taxa de não retorno a cio, como a motilidade progressiva (KASIMANICKAM *et al.*, 2006) e as diferentes velocidades (VAP, VSL e VSL) obtidas pelo CASA (NAGY *et al.*, 2015), outros trabalhos demonstraram que a motilidade isoladamente nem sempre consegue identificar touros de diferente fertilidade a campo (ZHANG *et al.*, 1999; KUTCHY *et al.*, 2019).

Um achado intrigante desse estudo foi relacionado à funcionalidade da membrana espermática antes e após o desafio. Isso porque, imediatamente após o descongelamento (avaliação do grupo controle), um dos touros de menor fertilidade a campo (touro 1) apresentou maior porcentagem de células funcionais com membrana plasmática íntegra comparado ao touro com maior taxa de prenhez (touro 6). Porém, após o desafio laboratorial, o resultado do teste hiposmótico demonstrou uma maior resistência do touro 6 comparado com o touro 4 ($P < 0,05$) e valores numericamente superiores ($P > 0,05$) aos touros 1 e 2.

Cabe ainda destacar que o touro 4 foi o touro com menor resistência ao desafio laboratorial aqui proposto. A baixa resistência do sêmen desse indivíduo foi evidenciada no grupo desafio, não apenas na característica integridade de membrana pelo HOST, mas também na MT e MP avaliadas pelo CASA e nas características motilidade e vigor convencionalmente analisados. Essas características seminais não se encontravam inferiores para o referido touro imediatamente após a descongelamento.

Considerando os presentes dados do teste hiposmótico após a descongelamento (grupo controle), outros estudos apontam dados contrastantes. Correa *et al.* (1997) e Tartaglione e Ritta (2004) demonstraram que a integridade e funcionalidade da membrana plasmática espermática avaliada através do teste hiposmótico após descongelamento apresenta alta correlação com a fertilidade. Além disso, o teste hiposmótico avaliado após 2 horas de incubação foi relacionado, em conjunto com outros parâmetros espermáticos (CASA e citometria de fluxo), com a fertilidade a campo de reprodutores bovinos (OLIVEIRA *et al.*, 2013). No entanto, outros estudos não confirmaram a capacidade de discriminar a fertilidade *in vivo* entre touros com diferenças

nas características seminais relacionadas com integridade de membrana isoladamente (ROTA *et al.*, 2000; BRITO *et al.*, 2003; BACINOGLU *et al.*, 2008). Ainda, Bacinoglu *et al.* (2008) demonstrou a possibilidade de diferenciar a fertilidade entre touros de acordo com sua integridade de membrana, mas somente quando a temperatura de incubação foi estabelecida em 41-46 °C, gerando um estresse térmico maior sobre as células.

Com relação aos resultados de integridade do DNA, não foram encontradas diferenças estatísticas, antes e depois do desafio. Assim, entende-se que as diferenças de fertilidade observadas entre os touros do presente estudo não estão relacionadas com diferenças nestas características espermáticas. Alterações do DNA podem ser observadas devido ao processo de criopreservação e descongelamento seminal, como também por tempos de incubação em meio de oviduto sintético (mSOF) (3 -12 horas), podendo ser diferentes dependendo do extensor e a raça de touro (WATERHOUSE *et al.*, 2010), situação que não aconteceu com nosso experimento, com 2 horas de incubação em atmosfera controlada.

Baixos índices de fragmentação do DNA e alta viabilidade celular foram correlacionados com o potencial reprodutivo do touro, predizendo 87% de seu potencial de fertilização (KASIMANICKAM *et al.*, 2006). Adicionalmente, Januskauskas *et al.*, 2001 demonstrou correlação negativa (-0,53) entre alta porcentagem de descompactação de DNA e fertilidade em touros. Avaliações de estrutura da cromatina espermática utilizando laranja de acridina (SCSA) também puderam diferenciar touros de maior e menor fertilidade, encontrando-se valores de fragmentação de DNA de 5% e 39%, respectivamente (SERAFINI *et al.*, 2015), enquanto outros estudos não conseguiram diferenciar, através da integridade do DNA, grupos de touros de alta e baixa fertilidade (KUTCHY *et al.*, 2019). Portanto, embora nossos resultados permitam sugerir que a fertilidade dos touros do presente experimento não foi influenciada por danos na cromatina, não se pode deixar de enfatizar que a alteração na integridade do DNA espermático pode ter alta influência na fertilidade a campo de touros em outros ensaios.

Características morfométricas que apresentaram diferenças entres os touros de interesse na análise com o azul de toluidina após a descongelação foram o fator de forma, o Fourier 1 e a simetria antero-posterior. Todos estes parâmetros foram diferentes entre os touros 1 e 6. Valores mais altos de fator de forma têm sido associado com imaturidade espermática e prejuízos na fertilidade (MARTINS *et al.*, 2021). Valores reduzidos de simetria antero-posterior têm sido relacionadas com alterações morfológicas da cabeça, indicando maior porcentagem de espermatozoides assimétricos na amostra, como por exemplo maior incidência de células que apresentam cabeças piriforme ou morfometricamente mais estreitas na porção posterior (BELETTI, COSTA e GUARDEIRO, 2005). Assim, nota-se que o touro 1 apresenta, após descongelação,

características morfométricas que podem ser consideradas inferiores ao touro 6. Após o desafio, as características obtidas no teste de azul de toluidina ficaram mais padronizadas entre os indivíduos de interesse. Apenas no fator forma as diferenças estatísticas observadas entre os touros 1 e 6 se mantiveram presentes, inferindo que esta característica não teve influência do desafio laboratorial e é intrínseca do touro 1. Embora maiores estudos se façam necessários para elucidar a real implicação destas características espermáticas na fertilidade a campo no contexto do presente estudo, não se pode deixar de considerar que os parâmetros morfométricos observados após descongelamento podem sugerir reduzida capacidade fertilizante do touro 1, justificando assim, pelo menos em parte, a menor fertilidade a campo do mesmo.

Por fim, os descritores de Fourier se relacionam com a caracterização detalhada da forma do perímetro da cabeça do espermatozoide (BELETTI, COSTA e VIANA, 2004). Especificamente o Fourier 1 reflete o arredondamento da parte anterior da cabeça espermática (OSTERMIER *et al.*, 2001), de modo que valores mais altos estão associados com formas mais redondas na parte anterior da cabeça espermática (e possivelmente maior assimetria da mesma), o que também foi observado no touro 1 em comparação ao touro 6, corroborando com os achados de fator-forma e simetria antero-posterior acima relatados. Segundo OSTEMIER *et al.* (2001b), amplitudes harmônicas de Fourier 0 e Fourier 2 têm apresentado a capacidade de diferenciar touros de diferentes fertilidades, onde animais de alta fertilidade apresentam valores superiores para essas características, demonstrando uma maior alongação do perímetro e uma forma mais cônica da cabeça, fazendo da cabeça uma estrutura mais hidrodinâmica. No presente experimento, entretanto, não houve diferença nas amplitudes harmônicas de Fourier 0 e 2 para nenhum dos touros

Com este estudo, portanto, desenvolveu-se um desafio laboratorial que mimetiza algumas condições do TRF das vacas, o qual nos permitiu identificar diferenças na resistência *in vitro* de amostras seminais de touros com variáveis taxas de fertilidade a campo, quando consideramos os parâmetros de motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática e motilidades total e progressiva do CASA.

Dentro de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que desafiou laboratorialmente as amostras de sêmen de diferentes touros, aplicando centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll® para seleção espermática, associado a uma incubação térmica em meio adicionado de heparina e ambiente controlado em atmosfera com baixa concentração de O₂ e umidade saturada, com a finalidade de mimetizar algumas condições encontradas no ambiente reprodutivo da fêmea bovina após a inseminação.

Assim, a hipótese de que o presente teste de resistência espermática (desafio laboratorial que mimetiza algumas das condições ambientais do trato reprodutivo da fêmea bovina), pode detectar diferenças na resistência *in vitro* de amostras de sêmen de reprodutores bovinos, que apresente relação mais assertiva com a fertilidade a campo, foi parcialmente confirmada. Embora tenha ficado claro que o sêmen de alguns apresenta diferente resistência ao desafio aqui proposto, as relações com a fertilidade a campo carecem de maiores confirmações.

Acreditamos que utilizando um maior número de touros e partidas, com diferenças mais acentuadas na fertilidade a campo entre eles, e com dados de inseminações de um número maior de fêmeas, seria possível identificar diferenças mais substanciais e significativas nos parâmetros seminais *in vitro* entre os touros avaliados após as amostras serem submetidas ao presente desafio laboratorial, que poderiam vir a ser mais substanciais e significativas com os resultados de campo.

8. CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um método de análise seminal *in vitro* que mimetiza algumas condições do trato reprodutor das vacas, o qual se mostrou uma interessante alternativa para ser realizado previamente às análises seminais *in vitro*, em comparação com a avaliação seminal tradicionalmente realizada imediatamente após a descongelação do sêmen bovino.

O desafio laboratorial aqui proposto permitiu identificar diferenças na resistência *in vitro* de amostras de sêmen de diferentes touros, considerando os parâmetros motilidade e vigor visualmente avaliados, funcionalidade da membrana plasmática avaliada pelo teste hiposmótico e motilidades total e progressiva fornecidas pelo sistema CASA.

Embora não tenha sido possível associar as características seminais *in vitro*, antes ou após o desafio laboratorial, com a fertilidade *in vivo* dos diferentes touros avaliados, o touro com maior fertilidade a campo apresentou melhor resistência e qualidade seminal após o desafio proposto em comparação com outros touros avaliados. Entretanto, maiores estudos se fazem necessários para confirmar a real capacidade do presente desafio laboratorial de identificar touros de maior e/ou menor taxa de concepção.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIKTEN, R.J., JONES, K.T., ROBERTSON, S.A. Reactive Oxygen Species and Sperm Function—In Sickness and In Health. *Journal of Andrology.*, v. 33, p. 1096-1106, 2012.
2. AKUTHAR, M. Dynamics of sperm-uterine interaction that initiates a maternal pro-inflammatory response in the cow [online]. Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, 2019. (Citado em 05/12/2021). Dissertation (Doctoral Program in Animal and Food Hygiene). Disponível na internet: <http://id.nii.ac.jp/1588/00004644/>
3. ANDERSSON, M., HELLMAN, T., HOLMSTRÖM, B-G., JOKINEN, L. Computerized and subjective assessments of post-thaw motility of semen from finnish ayrshire AI bulls in relation to non-return rate. *Acta. Vete. Scand.*, v.33, p. 89-93, 1992.
4. ANDERSSON, M., TAPONEN, J., KOSKINEN, E., *et al.* Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. *Theriogenology.*, v.61, p. 1583-1588, 2004.
5. 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. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, p.145-151, 2011.
6. BACINOGLU, S., TAS, M., CIRIT, U., *et al.* The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. *Animal Reproduction Science.*, v.104, p. 38-46, 2008.
7. BALASUBRAMANIAN. S., SON, W.J., MOHANA KUMAR, B., *et al.* Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. *Theriogenology.*, v. 68, p. 265-275, 2007.
8. BANE, A. A study on the technique of hemocytometric determination of sperm motility and sperm concentration in bull semen. *Cornell Veterinarian*, XLII, p. 518- 531, 1952.
9. BARUSELLI, P.S., REIS, EL., MARQUES, MO., NASSER, LF., BO, GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Animal Repro. Science.*, v.82-83, 479-486, 2004.
10. BARUSELLI, P.S., CATUSSI, B.L.C., DE ABREU, L.A., *et al.* Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. *Rev. Brasil. Reprod. Animal.*, v. 43, n.2, p. 308-314, 2019.
11. BARUSELLI, P.S. Mercado da IATF cresce 30% em 2020 e supera 21 milhões de procedimentos. Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 5ª ed., 2021. Acesso: 30/11/2021.

12. BELETTI, M.E., COSTA L.F., VIANA, M.P. A computational approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. *Biotechnic and Histochemistry.*, v.79, p. 17-23, 2004.
13. 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. Science.*, v.22, p. 85-90, 2005.
14. 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. *Animal Reproduction Science*, v.85, p.105–116, 2005b.
15. BERNDTSON, W.E., OLAR, T.T., PICKETT, B.W. Correlation between post-thaw motility and acrosomal integrity of bovine sperm. *Journal of Dairy Science.*, v. 64, p. 346-349, 1981.
16. BLOM E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*, v.25, p.383-339, 1973.
17. 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.
18. BÓ, G.A.; CUTAIA, L.; PERES, L.C., *et al.* Technologies for fixedtime artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. *Soc. Reprod. Fert. Suppl.*, v.64, p.223–236, 2007.
19. BOLLWEIN, H., BITTNER, L. Impacts of oxidative stress on bovine sperm function and subsequent *in vitro* embryo development. *Animal Reproduction Science.*, v.15 (Suppl.1), p.703-710, 2018
20. BREITBART, H., NAOR, Z. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reviews of Reproduction.*, v.4, p. 151-159, 1999.
21. BRITO, L.F.C., BARTH, A.D., BILODEU-GOESEELS, S., *et al.* 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.
22. CARREIRA, J.T., TREVIZAN, J.T., CARVALHO, I.R. *et al.* Does sperm quality and DNA integrity differ in cryopreserved semen samples from young, adult, and aged Nellore bulls? *Basical and Clinical Andrology.*, v.27, n.12. p. 1-8, 2017
23. CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; DE ANDRADE, A.F.C., *et al.* Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*, v.104, p.119–131, 2008.
24. CHAVEIRO, A., MACHADO, L., FRIJTERS, A., *et al.* Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic support. *Theriogenology.*, v.65, p. 1875-1890, 2006.

25. CORMIER, N., SIRARD, M.A., BAILEY, J.L. Premature Capacitation of Bovine Spermatozoa Is Initiated by Cryopreservation. *Journal of Andrology.*, v.18, p. 461-468, 1997.
26. CORMIER, N., BAILEY, J.L. A Differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa *Biology of Reproduction.*, v. 69, p. 177–185, 2003.
27. CORREA, J.R., ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology.*, v.42, p. 351-360, 1994
28. CORREA, J.R., PACE, M.M., ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology.*, v.48, p. 721-731, 1997.
29. CORREA, J.R, HEERSCHKE, G., ZAVOS, P.M. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. *Theriogenology.*, v.47, p. 715-721, 1997.
30. DINIZ, J.H.W., PERES, R.F.G., TEIXEIRA, A.C.B., RIVEROS, J.A.N., *et al.* Administration of PGF2a at the moment of timed-AI using sex-sorted or conventional semen in suckled nelore cows with different intensity of estrus behavior. *Theriogenology.*, v.174, p. 169-175, 2021.
31. EHRENWALD, E., FOOTE, R.H., PARKS, J.E. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm surface efflux. *Molecular Reproduction and Development.*, v.25, p. 195-204, 1990.
32. FELIPE-PÉREZ, Y.E., JUÁREZ-MOSQUEDA, M.L., HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E.O., *et al.* viability of fresh and frozen bull sperm compared by two staining techniques. *Acta Veterinaria Brasilica.*, v.2, p. 123-130, 2008.
33. FILHO, R.M., BELETTI, M.E., OLIVEIRA, F. Ultrastructure of bovine sperm chromatin. *Microscopy Research and Technique.*, v.78, p. 1117-1120, 2015.
34. FISCHER, B., BAVISTER, B.D. Oxygen control in the oviduct and uterus of control of monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility.*, v.99, p. 673-679, 1993.
35. GADELLA, B.M., LUNA, C. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm control. *Theriogenology.*, v.81, p. 74–84, 2014.
36. GIBSON, C.D., GRAHAM, E.F. The relationship between fertility and post-freeze motility of bull spermatozoa (by pellet freezing) without glycerol. *Reproduction.*, v.20, p. 155-157, 1969.
37. GUALTIERI, R., TALEVI, R. In Vitro-Cultured Bovine Oviductal Cells Bind Acrosome-Intact Sperm and Retain This Ability upon Sperm Release. *Biology of Reproduction.*, v.62, p. 1754–1762, 2000.

38. GUTTERIDGE, J., HALLIWELL B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Science.*, v. 15, p. 129-135, 1990
39. HAWK, H.W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *Journal of Dairy Science.*, v.66, p. 2645-2660, 1983.
40. HENNING, H., NGO, T.T., WABERSKI, D. Centrifugation stress reduces the responsiveness of spermatozoa to a capacitation stimulus in in vitro-aged semen. *Andrology.*, v.3, p. 834-842, 2015.
41. HILLERY, F.L.; PARRISH, J.J.; FIRST, N.L. Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. *Theriogenology*, v.33, p.249, 1990.
42. HO, K., WOLFF, C.A., SUAREZ, S.S. Catsper-null control spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reproduction Fertility and Development.*, v.21, p. 345-350, 2009.
43. HUNG, P.H., SUAREZ, S.S. Regulation of sperm storage and movement in the ruminant oviduct. *Society of Reproduction and Fertility supplement.*, v. 67, p. 257-266, 2010.
44. HUNTER, H.F., NICHOL, R., CRABTREE, S.M. Control of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, v.20, p. 1869-1875, 1980.
45. HUNTER, H.F., WILMUT, I. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, v.24, p. 597-608, 1984.
46. ISHIKAWA, Y., USUI, T., YAMASHITA, M., *et al.* Surfing and Swimming of Ejaculated Sperm in the Mouse Oviduct. *Biology of Reproduction.*, v.94, art. 89, p. 1-9, 2016
47. JANUSKAUSKAS, A., JOHANNISSON, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from swedish AI bull. *Theriogenology.*, v.55, p. 947-981, 2001.
48. JANUSKAUSKAS, A., SODERQUIST, L., HAARD, M.G., *et al.* Influence of sperm number per straw on the post-thaw sperm viability and fertility of swedish red and white a.i. bulls. *Acta Veterinaria Scandinavica.*, v.37, p. 461-470, 1996.

49. JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H., PEREZ-PELAEZ, M., *et al.* Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility.*, v.70, p, 219-228, 1984.
50. KASIMANICKAN, R., NEBEL, R.L., PEELER, L.D., *et al.* Breed differences in competitive indices of Holstein and Jerseybulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. *Theriogenology.*, v. 66, p. 1307-1315, 2006.
51. KHALIL, W.A., EL-HARAIRY, M.A., ZEIDAN, A.E.B., *et al.* Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine.* V.8, p. s49-s56, 2018.
52. KIPPER, B.H., TREVIZAN, J.T., CARREIRA, J.T., *et al.* Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on IVF. *Theriogenology.*, v.87, p. 154-160, 2017.
53. KUTCHY, N.A., MENEZES, E.S.B., UHUR, M.R., *et al.* Sperm cellular and nuclear dynamics associated with bull fertility. *Animal Reproduction Science.* v.211, n.106206, 2019.
54. LAMY, J., CORBIN, E., BLACHE, M.C., *et al.* Steroid hormones regulate sperm–oviduct interactions in the bovine. *Reproduction.*, v.154, p. 497-508, 2017
55. LAMY, J., NOGUES, P., COMBES-SOIA, L., *et al.* Identification by proteomics of oviductal sperm-interacting proteins. *Reproduction.*, v.155, p. 457-466, 2018.
56. LAPOINTE, J., BILODEAU, J.F. Antioxidant Defenses Are Modulated in the Cow Oviduct During the Estrous Cycle. *Biology of Reproduction.*, v. 68, p. 1157-1164, 2003.
57. LAYANYA, M., ARCHANA, S.S., SWATHI, D., *et al.* Sperm preparedness and adaptation to osmotic and pH stressors relate to functional competence of sperm in *Bos taurus*. *Scientific Reports.*, v.11, n.22563, 2021.
58. LEFEBVRE, R., CHENOWETH, P.J, DROST, M., *et al.* Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biology of Reproduction.*, v.53, p. 1066-1074, 1995.
59. LEFEBVRE, R., LO, M.C., SUAREZ, S.S. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biology of Reproduction.* v.56, 1198–1204, 1997.
60. LENZ, R.W., BALL, G.D., LEIBFRIED, M.L. *et al.* In Vitro Maturation and Fertilization of Bovine Oocytes are Temperature-Dependent Processes. *Biology of Reproduction.*, v.29, p. 173-179, 1983.

61. LEESE, H.J., TAY, J.Y., REISCHL, J., *et al.* Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction.*, v. 121, p. 339-346, 2001.
62. LIMA, PH., Adição de melatonina ao meio de maturação de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico *in vitro*: efeitos sobre as taxas de produção e qualidade de blastocistos. 60p. Tese (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Pós-graduação em Ciências Veterinárias, 2018.
63. LOMEIO, AM., GIAMBESERIO, AM. 'Water – Test': a simple method to assess sperm- membrane integrity. *International Journal of Andrology.*, v.14, p. 278-282, 1991.
64. LÓPES-ALBORS, O., LLAMAS-LÓPEZ, P.J., ORTUÑO, J.A., *et al.* *In vivo* measurement of pH and CO₂ levels in the uterus of shows through the estrous cycle and after insemination. *Scientific Reports.*, v.11, n. 3194, 2021.
65. 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
66. MANJUNATH, P., THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology.*, v. 53, p. 109-119, 2002.
67. MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.30, p.259-266, 1990.
68. MARQUEZ, B., SUAREZ, S.S. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of Reproduction.*, v.70, p. 1626-1633, 2004.
69. MARTINS, M.C., GONÇALVES, L.M., NONATO, A., *et al.* Sperm head morphometry and chromatin condensation are in constant change at seminiferous tubules, epididymis, and ductus deferens in bulls. *Theriogenology.*, v.161, p. 200-209, 2021.
70. MATOS, D.I., ARAÚJO, A.A., ROBERTO, I.G., TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.32, n.4, p.225-232, 2008.
71. MCGETRICK, J.A., REID, C.J., CARRINGTON, S.D. Improving bovine semen diluents: insights from the male and female reproductive tracts, and the potential relevance of cervical mucins. *Animal.*, v.8: s1, p. 173–184, 2014.
72. MELLO, M.L.S. Induced metachromasy in bull spermatozoa. *Histochemistry.*, v.74, p. 387-392, 1982.
73. 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

74. MILLER, D.J. Review: The epic control of sperm through the female reproductive tract. *Animal.*, v. 12:s1, p. s110-s120, 2018.
75. MITTAL, P.V., MADAN, A.K., SHARMA, V., *et al.* Cryopreservation of buffalo bull semen- restriction and expectation: a review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.*, v.8, p. 1351-1368, 2019.
76. MOHANTY, T.K., LONE, S.A., BHAKAT, K.A., *et al.* Sperm dosage and site of insemination in relation to fertility in bovines. *Asian Pacific Journal of Reproduction.*, v.7, p. 1-5, 2018.
77. MORIN, S.J. Oxygen tension in embryo culture: does a shift to 2% O₂ in extended culture represent the most physiologic system. *J. Assist. Reprod. Genet.*, v.34, p. 309–314, 2017.
78. MORRELL, J.M., VALEANU, A.S., LUNDEHEIM, N., *et al.* Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. *Acte Veterinaria Scandinavica.*, v.60, n.41, p 1-10, 2018.
79. MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update.*, v.3, n.5, p. 403–439, 1997.
80. MORTIMER, S.T. CASA-practical aspects. *Journal of Andrology.*, v.21, 515–524, 2000.
81. MOSTEK, A., DIETRICH, M.A., STOWINSKA, M., *et al.* Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. *Theriogenology.*, v. 92, p. 95-102, 2017.
82. MUIÑO, R., TAMARGO, C., HIDALGO, C.O., PEÑA, A.I. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science.*, v.109, p. 27–39, 2008.
83. MUIÑO-BLANCO, T., PÉREZ-PÉ, R., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in Domestic Animals.*, v.4, p. 18-31, 2008.
84. MURRAY, M.K. Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological changes in secretory status and cell height. *Biology of Reproduction.*, v.53, p. 653–663, 1995.
85. NAGY, S., JOHANNISSON, A., WAHLSTEN, T., *et al.* Sperm chromatin structure and sperm morphology: Their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. *Theriogenology.*, v.79, p. 1153-1161, 2013.
86. NAGY, A., POLICHRONOPOULOS, T., GÁSPÁRDY, A., *et al.* Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Veterinaria Hungarica.*, v.63, p. 370-381, 2015.

87. NAKANISHI, T., ISOTANI, A., YAMAGUCHI, R., *et al.* Selective Passage through the uterotubal junction of sperm from a mixed population produced by chimeras of calmegin-knockout and wild-type male mice. *Biology of Reproduction.*, v.71, p. 959-975, 2004.
88. NORONHA IM, COOKE RF, MARTINS CFG, *et al.* Administering an additional prostaglandin F2a injection to *Bos indicus* beef cows during a treatment regimen for fixed-time artificial insemination. *Anim Reprod Scienc.*, v.219, n.106535, 2020.
89. OLIVEIRA, L.Z. Utilização de diferentes touros na iatf: características seminais e suas relações com as taxas de fertilidade a campo. 2012. 195p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012.
90. OLIVEIRA, L. Z., DE ARRUDA, R. P., CESAR DE ANDRADE, A. F., *et al.* Assessment of field fertility and several *in vitro* sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. *Livestock Science.*, v.146, p. 38-46, 2012.
91. OLIVEIRA, L. Z., DE ARRUDA, R. P., CESAR DE ANDRADE, A. F., *et al.* Assessment of *in vitro* sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. *Animal Reproduction. Science.* v.137, p. 145–155, 2013.
92. ORR, T.J., ZUK, M. Reproductive 60ontr in mammals: na unexplored avenue for post-copulatory sexual selection. *Biological Reviews.*, p. 000-000, 2014.
93. OSTERMIER, G.H., SARGEANT, G.A., YANDELL., *et al.* Measurement of Bovine Sperm Nuclear Shape Using Fourier Harmonic Amplitudes., v.22, p. 595-603, 2001.
94. OSTERMIER, G.H., SARGEANT, G.A., YANDELL., *et al.* Relationship of Bull Fertility to Sperm Nuclear Shape. *Journal of Andrology.*, v.22, p. 595-603, 2001b.
95. PONS-REJRAJI, H., BAILEY, J.L., LECLERC, P. Cryopreservation affects bovine sperm intracelular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reproduction, Fertility and Development.*, v.21, p. 525 537, 2009.
96. PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., WINER, M.A. *et al.* Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction.*, v. 38, p. 1171-1180, 1988.
97. PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., HANDROW, R.R. *et al.* Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biology of Reproduction.*, v.40, p. 1020-1025, 1989.
98. PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., GRAHAM, J.K. *In vitro* capacitation of bovine spermatozoa: role of control of calcium. *Theriogenology.*, v.51, p. 461-472, 1999.
99. PERRY, G.A.; SMITH, M.F.; ROBERTS, A.J., *et al* Relationship between size of ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.*, v.85, p.684-689, 2007
100. PERRY, V.E.A. The role of sperm morphology standards in the laboratory assessment of bull fertility in Australia. *Frontiers in Veterinary Science.*, v.8, art.572058, 2021.

101. POLLARD, J.W., PLANTE, C., KING, W.A., *et al.* Fertilizing Capacity of Bovine Sperm May Be Maintained by Binding to Oviductal Epithelial Cells. *Biology of Reproduction.*, v.44, p. 102-107, 1991.
102. QIAO, F., GE, H., MA, X., *et al.* Bovine uterus-derived exosomes improve developmental competence of somatic cell nuclear transfer embryos. *Theriogenology.*, v.114, p. 199-205, 2018.
103. RICKARD, J.P., DE GRAAF, S.P. Sperm surface changes and their consequences for sperm transit through the female reproductive tract. *Theriogenology.*, v. 150, p. 96-105, 2020.
104. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology.*, v.68s, p. s138-s146, 2007.
105. RODRIGUES, W.B., SILVA, A.S., SILVA, J.C.B., *et al.* Timed artificial insemination plus heat II: gonadorelin injection in cows with low estrus expression scores increased pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol. *Animal.*, v.13:10, p. 2313-2318, 2019.
106. ROTA, A., PENZO, N., VICENTI, L., *et al.* Hypoosmotic swelling (hos) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology.*, v.53, p. 1415-1420, 2000.
107. SÁ FILHO, O.J.; MENEGHETTI, M.; PERES, R.; LAMB, G.; VASCONCELOS, J.L.M. Fixedtime artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows. II. Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*, v.72, p.210–218, 2009.
108. SÁ FILHO, M.F.; CRESPILO, A.M.; SANTOS, J.E.P.; *et al.* Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous 164 synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.120, p.23–30, 2010.
109. SÁ FILHO, M.F., PENTEADO, L., REIS, E.L., *et al.* Timed artificial insemination early in the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows. *Theriogenology.*, v.79, p. 625-632, 2013.
110. SAINT-DIZIER, M., MAHÉ, C., REYNAUD, K., TSIKIS, G. *et al.* Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology.*, v. 516, p. 110956, 2020.
111. SAACKE, R.G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology.*, v.70, p. 473-478, 2008.
112. SCHWARTZ, D., MACDONALD, D.M., HEUCHEL, V. On the relationship between the number of spermatozoa and the probability of conception. *Reprod. Nutri. Dévelop.*, v.21, p. 979-988, 1981.
113. SELLEM, E., BROEKHUIJSE, M.L.W.J., CHEVRIER, L. *et al.* Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology.*, v. 84, p. 1447-1454, 2015.

114. SERAFINI, R., ROMANO, J.E., VARNER., *et al.* Sperm DNA assays and their relationship to sperm motility and morphology in 62ontr (Bos Taurus). *Animal Reproduction Science.*, v.159, p. 77-86, 2015.
115. SHANNON, P., VISHWANATH., R. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Animal Reproduction Science.*, v.39, p. 1-10, 1995.
116. SHI, D.S.; LU, K.H.; GORDON, I. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. *Theriogenology*, v.41, p.1033–1043, 1990.
117. SHI, D.S., AVERY, A., GREVE, T. Effects of control of gradients on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriogenology.*, v.50, p. 667-674, 1998.
118. SIMON, L., LEWIS, S.E.M. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization *in vitro*? *Systems Biology in Reproductive Medicine.*, v.57, p. 133-138, 2011.
119. SODERQUIST, L., JANSON, L., LARSSON, K., EINARSSON, S. Sperm morphology and fertility in AI Bulls. *Journ. Vet. Med.*, v.38, p. 534-543, 1991.
120. SOUZA, E.T., SILVA, C.V, TRAVENÇOLO, B.A.N., *et al.* Sperm chromatin alterations in fertile and subfertile bulls. *Reproductive Biology.*, v.18, p. 177-181, 2018.
121. SUAREZ, S.S., PACEY, A.A. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update.*, v.12, p. 23–37, 2006.
122. SUAREZ, S.S. Control of hiperactivation in sperm. *Hum, Reprod.*, v.14, p. 647-657, 2008.
123. SUDANO, M.J., CRESPILOHO, A.M., FERNANDES, C.B., *et al.* Use of Bayesian Inference to Correlate In Vitro Embryo Production and In Vivo Fertility in Zebu Bulls. *Veterinary Medicine International.* art. 436381, 2011.
124. TARTAGLIONE, C.M., RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology.*, v.62, p. 1245-1252, 2004.
125. THÉRIEN, I., MANJUNATH, P. Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction.*, v.69, p. 408-1415,2003.
126. THOMPSON, J.G.E., SIMPSON, A.C., PUGH, P.A., *et al.* Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *Journ. Reprod. Fert.*, v. 89, p. 573-578, 1990.
127. THUNDATHIL, J.C., RAJAMANICKAM, G.D., KASTELIC, J.P. Na/K-ATPase and regulation of sperm function. *Animal Reproduction Science.*, v.15, (Suppl.1), p.711-720. 2018

128. TUNG, C., LIN, C., HARVEY, B., *et al.* Fluid viscoelasticity promotes collective swimming of sperm. *Scientific Reports.*, v.7. n. 3152, 2017.
129. UTT, M.D. Prediction of bull fertility. *Animal Reproduction Science.*, v.169, p. 37-44, 2016.
130. VASCONCELOS, AB., SANTANA, MA., SANTOS, AMC., *et al.* Metabolic evaluation of cooled equine spermatozoa. *Andrology.*, v.42, p. 106-111, 2010.
131. VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONELIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.*, v.57, p. 149-179, 2002.
132. VINCENT, P., UNDERWOOD, S.L., DOLBEC, C., *et al.* Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Animal Reproduction Science.*, v.9, n.3, p.153-165, 2012
133. VISCONTI, P.E., GALANTINO-HOMER, H., MOORE, G.D., BAILEY, J.L. *et al.* The molecular basis of sperm capacitation. *Journal of Andrology.*, v.19, p. 242-248, 1998.
134. 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.
135. WOOD, P.D.P., WOULKES, J.A., SHAW, R.C. Semen assessment, fertility and the selection of Hereford Bulls for use in AI. *Reproduction.*, v.76, p. 783-795, 1986.
136. WEI, H.; FUKUI, Y. Effects of bull, sperm type and sperm pretreatment on male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.11, p.59-65, 1999.
137. WROBEL, K.H., KUJAT, R., FEHLE, G. The bovine tubouterine junction: general organization and surface morphology. *Cell Tissue Res.*, v.271, p. 227-239, 1993.
138. YOUSEF, M.S., MAREY, M.A., HAMBRUCH, N. Sperm binding to oviduct epithelial cells enhances tgfb1 and il10 expressions in epithelial cells as well as neutrophils in vitro: prostaglandin e2 as a main regulator of anti-inflammatory response in the bovine oviduct. *PLoS One.*, v.11, e0162309, 2016.
139. 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.
140. ZHANG, B.R., LARSSON, B., LUNDEHEIM, N., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI Bulls. *International Journal of Andrology.*, v.21, p. 207-216, 1998.

I. Apêndice

Quadro 1. Configurações (SETUP) da análise computadorizada da cinética espermática (Sistema CASA)

CARACTERÍSTICA	AJUSTE
Número de imagens adquiridas	30
Taxa de aquisição de imagens	60 Hz
Contraste mínimo da célula	50
Tamanho mínimo da célula	6 pixels
Contraste da célula estática	30
Referência de retilinearidade	60%
Referência de velocidade do trajeto	30 $\mu\text{m/s}$
Referência de velocidade retilinear	20 $\mu\text{m/s}$
Tamanho estático da cabeça espermática	0,23 a 1,91
Limite de alongamento da célula	8 a 92%
Aumento	1,89 x