



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**QUALIDADE DO SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO E TAXA DE
PRENHEZ NA IATF**

CAMILE SANCHES SILVA

CAMPO GRANDE-MS
AGOSTO/2019

CAMILE SANCHES SILVA

**QUALIDADE DO SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO E TAXA DE
PRENHEZ NA IATF**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias
como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Ciências
Veterinárias.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Vianna da Costa e Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Ériklis Nogueira

Prof. Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio

**CAMPO GRANDE-MS
AGOSTO/2019**

“Aos meus pais, Neuza e Marcos (*in memoriam*), com amor e gratidão, dedico este trabalho”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por esse tempo de desafios, de conquistas, de aprendizado, de renúncias, de perseverança e de esperas - “Há tempo para todo propósito debaixo do céu (Ecl.,3)”.

À minha mãe Neuza M. Sanches, pela vida, pela companhia de sempre, por ser esteio em minhas exaustões e impulso em minhas incertezas. Todo meu carinho e eterna gratidão à mulher que amo e dedico toda minha existência.

Ao meu pai Marcos (*in memorian*), meus avós Diego (*in memorian*) e Cecilia, Carmelinda e Duarte (*in memorian*) e demais familiares que entenderam minhas ausências, acreditaram e torceram por mim. Agradeço.

Ao meu namorado Wagner R. Garcia, que dentre tantas reviravoltas, foi a grata surpresa que a “reprodução” me trouxe, meu par e companheiro de horas a fio, que não me deixou desistir e que me mostra todos os dias que recomeçar é possível. Que possamos olhar sempre juntos e para a mesma direção. Gratidão.

À Professora e orientadora Dr^a Eliane Vianna da Costa e Silva, por tamanha oportunidade. Ao prof. Breno Fernandes Barreto Sampaio e demais professores, discentes e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, estendo meus agradecimentos.

Ao Dr. Érikis Nogueira, pela “adoção”, inestimável ajuda e confiança, através do qual agradeço também os demais colaboradores e pesquisadores da Embrapa, em especial a Dr^a Margot Alves Nunes Dodge, pela contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

Aos pesquisadores externos, Walvonwitis Baes Rodrigues e José Roberto Potiens, pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa. A conclusão desse trabalho também é fruto da dedicação de vocês.

Aos colegas que adquiri nesse trajeto, em especial àqueles que fizeram melhores os meus dias. Aos velhos e aos novos amigos, minha gratidão pelas palavras de incentivo, pelos abraços reconfortantes e pelos sorrisos sinceros.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À CRV – Lagoa pela contribuição na concessão dos dados e amostras.

À Embrapa Pantanal, Gado de Corte e Cenargen por subsidiar a pesquisa.

Minha gratidão àqueles que vieram antes e me conduziram até aqui. A todos que direta ou indiretamente se propuseram a ser luz nesse caminho, embora não nomeados, no coração não falta ninguém.

Elevo os meus olhos para os montes: de onde me virá socorro?

O meu socorro virá do Senhor, criador do céu e da terra.

Ele não permitirá que teus pés resvaalem; não dormirá aquele que te guarda.

Não, não há de dormir, nem adormecer o guarda de Israel.

O Senhor é teu guarda, o Senhor é teu abrigo, sempre ao teu lado.

De dia, o sol não te fará mal; nem a lua durante a noite.

O Senhor te resguardará de todo o mal; ele velará sobre tua alma.

O Senhor guardará os teus passos, agora e para todo o sempre.

(Salmo 120)

“Cruz Sacra Sit Mihi Lux”

São Bento

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	8
 CAPÍTULO 1	
1.INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
3.REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 Análises convencionais de sêmen	12
3.2 Integridade de membrana	13
3.3 Análise computadorizada de sêmen	14
3.4 Citometria de fluxo	15
3.5 Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade.....	17
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
 CAPÍTULO 2	
SÊMEN QUALITY OS NELORE AND ANGUS BULLS CLASSIFIED BY FERTILITY INDEXES	25
 CAPÍTULO 3	
QUALITY OF CRYOPRESERVED NELORE OR ANGUS BULLS SEMEN AND FERTILITY OF BOVINE FEMALES IN TAI PROGRAMS.....	46

RESUMO: A proposta do trabalho de tese foi identificar parâmetros clínicos para os critérios de avaliação quantitativos e qualitativos utilizados para análise do sêmen criopreservado. Para tanto foram realizadas duas abordagens experimentais: *Experimento 1* - Objetivou-se com a execução do presente trabalho, correlacionar os atributos quantitativos e qualitativos do sêmen criopreservado de touros Nelore e Angus, avaliados por meio de análises morfofuncionais convencionais, citometria de fluxo e análise computadorizada de sêmen, com a fertilidade a campo, obtida pela taxa de prenhez de vacas Nelore submetidas à IATF. Foram utilizadas doses de sêmen de 28 touros (Nelore e Angus) para avaliação da morfologia e cinética espermática, por citometria de fluxo e análise computadorizada (CASA). O índice de fertilidade foi efetivo para separar os touros em diferentes classes de fertilidade ($P < 0,001$). Tanto a categoria ($P < 0,001$) quanto o ECC ($P < 0,005$) da vaca exerceram efeito sobre a fertilidade. O modelo completo, incluindo algumas análises de citometria e CASA, apresentou maior correlação ($R^2 = 0.458$) com os índices de fertilidade dos touros, demonstrando haver efeito positivo da motilidade progressiva, velocidade média (VAP, $\mu\text{m/s}$), integridade de membrana e potencial mitocondrial e efeito negativo sob a velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$ e integridade acrossomal, demonstrando que estes parâmetros associados podem potencialmente prever a fertilidade de touros. *Experimento 2* - Este trabalho avaliou as taxas de prenhez à IATF de touros Angus e Nelore, no Pantanal e Cerrado do Mato Grosso do Sul, além de correlacionar diferentes métodos de avaliação laboratorial de sêmen pós-descongelamento com a taxa de prenhez de vacas zebuínas submetidas a protocolos de IATF, através de análises de regressão logística entre a prenhez e os parâmetros avaliados individualmente. Foram utilizados 20 touros (10 Nelore e 10 Aberdeen Angus) e 1542 vacas Nelore, alocadas em duas fazendas distintas. Foram realizadas análises físicas, funcionais e morfológicas por métodos convencionais subjetivos, análise computadorizada de sêmen (CASA) e citometria de fluxo. As taxas de prenhez à IATF foram maiores no Planalto em relação ao Pantanal ($P = 0.003$). A taxa de prenhez entre touros oscilou de 22,9 a 59,4% ($P = 0,016$) e variou por raça, sendo maior com sêmen de touros Nelore (53,09%) do que Angus (47,5%, $P = 0.037$), entretanto, não houve interação entre raça e bioma. Em relação às variáveis de qualidade seminal, observou-se efeito de defeitos totais e maiores, VAP (velocidade progressiva), velocidade curvilínea (VCL), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e amplitude lateral de cabeça (ALH) sobre a probabilidade de prenhez de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF. Concluiu-se que nas condições propostas, a raça do touro e o bioma exercem considerável influência nas taxas de prenhez à IATF e que a avaliação de sêmen é importante para identificar amostras com maior potencial fertilizante.

Palavras-chave: espermatozoide, fertilidade, touro

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O rebanho bovino nacional é composto por aproximadamente 214,69 milhões de cabeças, criadas predominantemente em pastos, distribuídos em 162 milhões de hectares. Com o abate anual de 44 milhões de animais, o país se destaca como o maior exportador mundial de carne bovina (ABIEC, 2019).

Com o objetivo de aumentar a produtividade e melhorar a composição genética do rebanho, a incorporação da inseminação artificial (IA) é considerada a biotecnologia mais importante no sistema de produção pecuário, uma vez que representa uma ferramenta chave para a obtenção de animais com maior mérito genético. Apesar dos evidentes avanços na produção de gado de corte e leite, conferidos pelo desenvolvimento comercial da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), apenas 12% do rebanho bovino brasileiro foi inseminado no último ano (ASBIA, 2018).

Não obstante a inquestionável melhoria na produtividade conferida pela IATF, a baixa adesão a esta biotécnica pode estar associada à variedade de resultados, conferida por fatores inerentes à fêmea (p.ex. anestro pós-parto, baixa condição corporal), gestão da propriedade (BÓ et al., 2003; BISINOTTO et al., 2012) e também aqueles relativos à qualidade do sêmen utilizado nos programas, tais como os padrões de movimento espermático, integridade de membrana plasmática ou dose inseminante praticada (CRESPILO, 2007; OLIVEIRA et al., 2012).

É evidente que o sêmen utilizado na IATF tem grande impacto sobre a taxa de prenhez, ainda que se utilizem aqueles avaliados em testes laboratoriais simples e que atendam aos padrões mínimos de qualidade (ANDERSSON et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2011a,b). Dessa forma, a avaliação espermática laboratorial tem o intuito de analisar o potencial de fertilidade de um indivíduo, determinar e estabelecer características confiáveis que possam ser utilizadas como indicadores de fertilidade (AMANN e HAMMERSTEDT, 1993).

Rotineiramente, a qualidade seminal é estimada por avaliações subjetivas de motilidade, proporção de espermatozoides morfolologicamente normais e concentração

de espermatozoides por dose (ARRUDA et al., 2005; CRESPILO et al., 2006). Entretanto, esses métodos são insuficientes para determinar a real fertilidade do material (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997), uma vez que não são avaliados os processos necessários para a fecundação, tais como a capacitação e a reação acrossômica (LONERGAN et al., 1994).

Nenhum teste laboratorial utilizado isoladamente pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen (ARRUDA et al., 2003; SUDANO et al., 2011). Naturalmente que o método mais eficiente e preciso para estimar a fertilidade de touros são os desafios a campo (ZHANG et al., 1999), entretanto são onerosos, morosos e laboriosos (LARSSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000).

Enfatizada a importância da qualidade do sêmen para a melhoria da eficiência reprodutiva dos processos de inseminação artificial, propõe-se associar técnicas laboratoriais simples, rotineiramente utilizadas para análise seminal (como a motilidade e morfologia espermática) às outras mais complexas (p.ex. integridade de membrana e análise computadorizada) e correlacioná-las com a taxa de prenhez na IATF.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a relação entre parâmetros de qualidade do sêmen bovino criopreservado com a taxa de prenhez na IATF.

2.2. Objetivos específicos

- Correlacionar diferentes métodos de avaliação da qualidade do sêmen bovino criopreservado com a taxa de prenhez em vacas submetidas à IATF;
- Identificar a associação de tecnologias de avaliação seminal que melhor caracterizem a eficiência de touros à IATF;
- Avaliar a taxa de prenhez em vacas submetidas à IATF com a utilização de sêmen de eficiência comprovada nos diferentes métodos de determinação da viabilidade espermática, em diferentes biomas (Pantanal e Planalto) e raças (Nelore e Angus);
- Verificar a variação na qualidade do sêmen de touros de alta e baixa fertilidade.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Análises convencionais do sêmen

A motilidade espermática é uma avaliação importante e vastamente utilizada, por ser esta uma característica essencial para a migração do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea e para a interação dos gametas na fecundação (RODRÍGUEZ-MARTINEZ, 2006). O método indireto e predominantemente utilizado na constatação da cinética do movimento espermático é a determinação subjetiva da porcentagem de células móveis em uma amostra de sêmen, por meio da microscopia ótica. Embora simples e de baixo custo, essa metodologia pode apresentar grande variabilidade (GARNER et al., 1997).

Para a avaliação morfológica, Blom (1972) associou uma classificação baseada no grau de importância da anormalidade espermática para a fertilidade, sendo os defeitos maiores aqueles de grande relevância no comprometimento da fertilidade do touro (*pouch formation*, cabeça isolada anormal, cauda fortemente dobrada) e os defeitos menores (cabeça isolada normal, gota distal, defeitos de implantação) aqueles de menor importância, que não comprometem a fertilidade.

Posteriormente, Saacke et al. (1994) propuseram uma classificação de defeitos baseada na capacidade do espermatozoide em alcançar o oócito, ligar-se e penetrar na zona pelúcida e iniciar o bloqueio à polispermia. Quando esses desafios podem ser superados ou minimizados com o aumento na concentração de espermatozoides por dose inseminante, esses defeitos são classificados como compensáveis. Os demais defeitos, tidos como não compensáveis, relacionam-se com falhas na competência do espermatozoide, independente ao aumento na concentração da dose inseminante.

A análise morfológica da célula espermática é usualmente realizada para controle da qualidade seminal, no entanto, quando utilizada isoladamente não é capaz de estimar a fertilidade de uma amostra, sendo por isso recomendada a avaliação conjunta de outras características (CHACÓN e KAISER, 2001). As características morfológicas são usualmente analisadas utilizando-se esfregaços corados (Karras, Cerovisky, Giemsa, Eosina-nigrosina) em microscopia ótica ou câmera úmida em microscopia de contraste de fase ou contraste de interferência diferencial, DIC (CBRA,

2013; CELEGHINI, 2005). Os esfregaços corados apresentam menor acuidade pela maior ocorrência de artefatos inerentes à técnica, tais como cabeça isolada, defeitos de cauda e, por outro lado, subvalorização de alguns defeitos maiores, como os de acrossoma e vacúolos (FRENEAU et al., 2010).

Ao avaliar a correlação de testes laboratoriais e a fertilidade de touros, observa-se que a equação derivada da morfologia espermática é a de maior valor preditivo (PHILLIPS et al., 2004). A fertilidade do touro diminui quando as células espermáticas anormais excedem 20% de defeitos totais e 10% de defeitos maiores (AX et al., 2004).

O teste de termorresistência (TTR) foi proposto por Dimitropoulos (1967) para a avaliação da fertilidade potencial de partidas de sêmen criopreservado de bovinos e foi, posteriormente, adaptado para as demais espécies. Esse teste consiste na incubação de uma amostra de sêmen descongelado em banho-maria, a 46°C por 30 minutos (teste rápido) ou a 38°C por 5 horas (teste lento), para análise da motilidade progressiva e do vigor espermático.

3.2. Integridade de membrana

Os espermatozoides são células altamente diferenciadas e especializadas, cuja integridade e funcionalidade das membranas plasmáticas são de importância fundamental para o metabolismo espermático, capacitação, reação do acrossoma, ligação e penetração do ovócito (HOLT, 2000; BRITO et al., 2003; ARRUDA et al., 2006). Assim sendo, diversos testes têm sido propostos para avaliar a completude dessa estrutura, entre eles os esfregaços secos corados com eosina, conjugada ou não à nigrosina (HANCOCK, 1951) ou com azul de tripan (WILSON et al., 1969) e testes hiposmóticos (HOST; JEYEDRAN et al., 1984).

Através de trocas com o meio externo, as membranas celulares são responsáveis pela manutenção da homeostase, por permitir o transporte seletivo de moléculas (REVELL e MRODE, 1994). No HOST, ao ser adicionado em uma solução hiposmótica, espermatozoides com membrana íntegra e funcional permitem a passagem de água para o interior da célula, ocorrendo um aumento do volume celular e conseqüentemente, dobramento da cauda (FUSE et al., 1993).

3.3. Análise computadorizada de sêmen

No intuito de obter maior precisão e objetividade na avaliação da motilidade, outros testes têm sido propostos, dentre eles, a análise computadorizada do movimento espermático (CASA). Essa técnica representa um método que fornece informações sobre as propriedades cinéticas de um ejaculado, baseando-se na avaliação individual das células (FERREIRA et al., 1997; JANUSKAUSKA e ZILINSKAS, 2002).

Fundamenta-se na obtenção de imagens precisas dos espermatozoides móveis, obtidas através de uma leitura do campo com uma série consecutiva de *flashes*. As imagens obtidas reconstroem a trajetória espermática através de um microprocessador e fornecem, não somente a porcentagem de células móveis, mas também as características específicas do movimento espermático (GARNER et al., 1997), tais como: velocidade média do percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %), conforme demonstrado na figura 1.

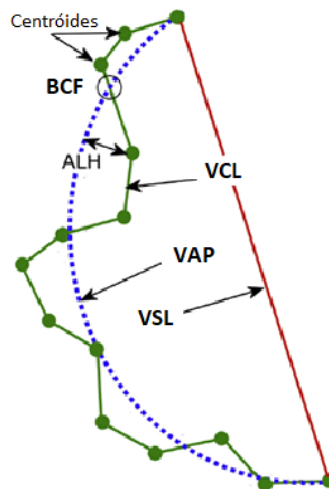


Fig 1. Representação esquemática das terminologias do CASA (PAYAN-CARREIRA et al., 2013; Adaptado)

VCL: Velocidade média ao longo da trajetória real do espermatozoide, obtida pela conexão dos centróides ao longo do percurso.

VAP: Velocidade média estabelecida a partir do cálculo do caminho médio do percurso.

VSL: Velocidade média ao longo do trajeto linear traçado do primeiro ao último centróide.

ALH: Amplitude de deslocamento lateral da cabeça, determinado pela distância de cada centróide do caminho médio.

BCF: Frequência de batimento cruzado, determinado pela quantidade de vezes que o caminho curvilíneo cruza o caminho médio.

No entanto, até mesmo o CASA não é capaz de proporcionar dados consistentes sobre a probabilidade de concepção, quando utilizado isoladamente, uma vez que a motilidade espermática representa apenas um dos vários pré-requisitos básicos indispensáveis para que os espermatozoides concluam com êxito sua função biológica, representada pela fertilização do ovócito (GRAHAM e MOCÉ, 2005).

O sistema CASA pode ainda apresentar algumas falhas em decorrência da dificuldade na manutenção da concentração espermática e da formação de debris quando da utilização de meios diluentes com tamanho semelhante ao do espermatozoide (por ex. gema de ovo). Esses fatores fazem com que o sistema reconheça essas partículas como células imóveis, comprometendo a leitura da amostra. Entretanto, um equipamento mais recente apresenta a ferramenta IDENT que, baseada no uso de uma sonda fluorescente (Hoechst 33342) é capaz de identificar e computar apenas células com DNA corado (ARRUDA et al., 2010). Além disso, essa técnica também pode apresentar problemas operacionais, a depender da habilidade do técnico e da construção dos templates de leitura.

3.4. Citometria de fluxo

Em detrimento das avaliações de sêmen convencionais, as análises baseadas na citometria de fluxo são quantitativas, altamente reproduzíveis e rapidamente avaliam milhares de espermatozoides por amostra (CHRISTENSEN et al., 2004). Essa técnica possibilita a contagem, classificação e isolamento da célula espermática que, marcadas por um corante fluorescente específico, são individualmente movidas em fluxo laminar e então contadas e avaliadas quanto a diversas características, tais como integridade da membrana plasmática e acrossomal, viabilidade e função celular (PENÃ, 2015).

Numerosos biomarcadores estão disponíveis ou em desenvolvimento para utilização na avaliação de espermatozoides por meio da citometria de fluxo. Alguns, como a ubiquitina e PNA (lecitina *Arachis hypogaea* glutinina), apenas estão presentes no espermatozoide de má qualidade e são geralmente referidos como biomarcadores negativos. Outros, tais como os utilizados para avaliar a membrana mitocondrial (THOMAS et al, 1997), a integridade de membrana (GARNER et al.,

1994; THOMAS et al., 1997) e a proteína de ligação ao domínio pós-acrossomal (PAWS; WU et al., 2007), estão presentes em quantidades variáveis, dependendo da qualidade dos espermatozoides.

A anexina V é uma proteína de ligação Ca^{2+} dependente e que apresenta elevada afinidade pela fosfatidilserina (PS), um fosfolípido presente no lado citosólico da membrana celular (MARTIN et al., 1995) que, por ocasião da apoptose, importante efeito colateral do estresse oxidativo, torna-se exposta ao meio extracelular (KIM et al., 2010). Quando conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) mantém sua alta afinidade pela PS e, consequentemente serve como uma sonda sensível que pode ser utilizada na citometria de fluxo para detecção da morte celular (apoptose ou necrótica), caracterizada pela perda de assimetria da membrana (GRAVRIELI et al., 1992). Se uma coloração vital for associada, como o iodeto de propídio (IP), a combinação permite distinguir três sub-populações espermáticas: viável (Anexina-FITC-PI-negativa), apoptótica precoce (Anexina-FITC positiva e PI-negativa) e apoptótico tardio (Anexina-FITC-PI-positivo; RAMALHO-SANTOS et al., 2007).

A estabilidade da membrana espermática também pode ser avaliada pelo uso da merocianina 540 (MC540), uma sonda hidrofílica com lipídeos, altamente desorganizados e de afinidade por membranas instáveis. Ela permite monitorar as alterações na arquitetura lipídica da membrana celular, através da identificação de populações de espermatozoides com membranas intactas desprovidas de fluorescência e espermatozoides com membranas celulares desordenadas que emitem fluorescência (HALLAP et al., 2005).

Para testar a funcionalidade mitocondrial (SOUSA et al., 2011) têm-se os corantes chamados MitoTracker® e estão disponíveis nas cores vermelho, verde e laranja, que se difundem através da membrana plasmática e acumulam-se em mitocôndrias ativas. A JC-1 é uma sonda de dupla emissão, que emite diferentes cores fluorescentes de acordo com o potencial de membrana (IMM): após a incubação, o JC-1 é capturado por mitocôndrias funcionais, corando em verde o IMM polarizado e de laranja ou vermelho se o IMM for despolarizado.

3.5. Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade

A fertilidade em bovinos é um processo multifatorial, que envolve desde a qualidade do sêmen, fertilidade da vaca, manejo adequado do rebanho até o período adequado para realização de inseminação artificial (SELEM et al., 2015). Entretanto, enquanto uma fêmea deixa no máximo um descendente ao ano no rebanho, os touros deixam número muito maior, sobretudo quando da utilização de IA, evidenciando o impacto da qualidade do sêmen na fertilidade.

Nesse sentido, a identificação de preditores efetivos da fertilidade dos espermatozoides beneficiaria a indústria de sêmen, possibilitaria o surgimento de novas terapias para a infertilidade, tanto em homens quanto em animais e, além disso, permitiria uma melhor compreensão dos efeitos colaterais das tecnologias de congelamento, descongelamento e sexagem, sobre a integridade e funcionalidade espermática (PAYAN-CARREIRA et al., 2013).

No entanto, para que a célula espermática seja capaz de alcançar o local de fertilização, penetrar o ovócito e ativar o desenvolvimento embrionário (BRAUNDMEIER e MILLER, 2001), muitos atributos dos espermatozoides são necessários, uma vez que a qualidade do sêmen está diretamente relacionada com a fertilidade de touros, embora o método mais seguro de avaliação seja por meio da taxa de prenhez (ARRUDA et al, 2011).

As avaliações espermáticas *in vitro* variam desde testes subjetivos, sob microscopia óptica, até análises proteômicas. Entretanto, a motilidade e a morfologia espermática figuram como um dos preditores mais importantes de fertilidade (UTT, 2016). A correlação positiva da motilidade com a fertilidade tem sido demonstrada há décadas por métodos subjetivos (BERNDTSON et al., 1981) e análises computadorizadas (KATHIRAVAN et al., 2011; AMANN e WABERSKY, 2014). No que concerne à morfologia, anormalidades de vários tipos são descritas e correlacionadas com a redução da fertilidade de touros (GILLAN et al., 2008) e aumento da mortalidade embrionária (WALTERS et al., 2005).

Além desses, vários outros parâmetros funcionais têm sido propostos como fatores-chave na fertilidade dos espermatozoides, tais como integridade de membrana (FLESCH e GADELLA, 2000) e acrossoma (OURA e TOSCHIMORI, 1990), atividade mitocondrial (THOMAS et al., 1998; GRAHAM e MOCÉ, 2005) por estar diretamente

relacionada com a motilidade da célula e também, a integridade da cromatina, uma vez que quando danificada pode levar a morte embrionária ou fetal precoce ou ainda comprometer a saúde da prole (EVERSON e JOST, 2000).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC. Associação brasileira das indústrias exportadoras de carne, 2019. Disponível em: www.abiec.com.br/estatísticas. Acesso em 16 de julho de 2019.
- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, H.P. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **J Androl**, v.14, p.397-405, 1993.
- AMANN, R.P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, p. 5-17, 2014.
- ANDERSSON, M.; TAPONENA, J.; KOSKINENA, E.; DAHLBOMB, M. 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.
- ARRUDA R. P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121f. **Tese** (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; PERES, K. R.; NEVES, L. C. Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF. **In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 2, 2006, Londrina, PR. Londrina: [s.n.], 2006. p.157-164
- ARRUDA, R.L.; ORROS, I. R.; PASSOS, T. S.; COSTA E SILVA, E. V.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Rev Bras Reprod Anim.**, v.34, p.168-184, 2010.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Sci Vet (Suplemento)**. Porto Alegre: Brasil, 2003. p.230-231.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J.D.; Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev Bras Reprod Anim**, v.35, p.145-151, 2011.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; SOUZA, L.W.O.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; GARCIA, A.R. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Sci Vet.**, v.33, supl.1, p.145-150, 2005.
- ASBIA - Associação brasileira de inseminação artificial. Índex ASBIA- importação, exportação e comercialização de sêmen - 2017. Disponível em: www.asbia.org.br. Acesso em: 19 de outubro de 2018.
- AX, R. L.; DALLY, M. R.; DIDION, B. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E. Inseminação Artificial. **In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (eds). Reprodução Animal**. Barueri, SP: Manole, p. 369-379, 2004.

- BERNDTSON, W.E.; OLAR, T.T.; PICKETT, B.W. Correlation between post-thaw motility and acrosomal integrity of bovine sperm. **J Dairy Sci**, v. 64, p. 346-349. 1981.
- BISINOTTO, R.S.; CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E.P. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 93, p. 3578–3587, 2012.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the Bull spermogram. **In: Symposium International di Zootechnie**, 7, 1972, Milano. The Symposium, 1972. p.125-139.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 78, n. 3-4, p. 307- 326, 2003. doi: 10.1016/S0378-4320(03)00097-6.
- BRAUNDMEIER, A. G.; MILLER, D. J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **J Dairy Sci**, v.84, p.1915-1925, 2001.
- BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU, S.G.; PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen de animal**, 3ed. Belo Horizonte: CBRA; 2013.
- CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 186f. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.
- CHACÓN, J.; KAISER, L. Assessment of sperm morphology in zebu bulls, under field conditions in the tropics. **Reprod Domest Anim**, 36:91-99, 2001.
- CHRISTENSEN, P.; STENVANG, J. P.; GODFREY, W. L. A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. **J Androl**, v. 25, n. 2, p. 255-264, mar-apr. 2004.
- CRESPILHO, A.M. Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo-fixado (IATF). 2007. 124f. **Dissertação** (Mestrado, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- CRESPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; ALBERTI, K.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; MARTINS Jr, A.; NOVAES, J.L.C.; DELL'AQUA JR, J.A. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. **Ars Vet**, v. 22, n.3, p.229-235, 2006.
- DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperme congelé. **Anim Med Vet**, v.4, p.215-224, 1967.
- EVENSON, D.P.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Method Cell Sci**, v.22, p.169–189, 2000.

- FERREIRA, J.C.P.; NEVES NETO, J.R.; PAPA, F.O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. **Rev Bras Reprod Anim**, v.21, p.131-32, 1997.
- FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochem Biophys**, v. 1469, p. 197-235, 2000.
- FRENEAU, G.E.; CHENOWETH, P.J.; ELLIS, R.; RUPP, G. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. **Anim Reprod Sci**, v.118, p.176-181, 2010.
- FUSE H.; OHTA, S.; SAKAMOTO, M.; KAZANA, T.; KATAYAMA. Hypoosmotic swelling test with a medium of distilled water, **Arch Androl**, v.30, p.111-116, 1993.
- GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W.; DEJANERTTE, J. M; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Reprod Biol**, v. 57, p. 1401-1406, 1997.
- GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A.; YUE, S.T.; ROTH, B.L.; HAUGLAND, R.P. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. **J Androl**, v.15, p.620-629, 1994.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol**, v. 119, p. 493–501, 1992.
- GILLAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W. M.; EVANS, G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Anim Reprod Sci**, v. 103, p.201–14, 2008.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Reprod Biol**, v.43, p.55-64, 1990.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.
- HALLAP, T.; NAGY, S.; HAARD, M.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen is maintained over age in AI bulls. **Theriogenology**, v.63, p. 1752-1763, 2005.
- HANCOCK, J.L.A. Staining technique for the study of temperature-shock in semen, **Nature**, v.24, p.323-324, 1951.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, 2000, v. 53, p.47-58.
- JANUSKAUSKAS, A., ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. **Vet Zoot**, v.39, p.1-8, 2002.
- JEYEDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ P. M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J Reprod Fert**, v. 70, p. 219-228, 1984.

- KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; KARTHIKEYA, G.; RENGARAJAN, K.; KADIRVEL, G. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system-a review. **Reprod Domest Anim**, v. 46, p. 165-172, 2011.
- LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict sêmen fertility? **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, p. 327–336, 2000.
- LONERGAN, P.; KOMMISRUUD, E.; ANDRESEN, O.; REFSDAL, A.O.; FARSTAD, W. Use of semen from a bull heterozygous for the translocation in an IVF program. **Theriogenology**, v. 41, p. 1379-1384, 1994.
- MARTIN, S.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; MCGAHON, A.J.; RADER, J.A.; VAN SCHIE, R.C.; LAFACE, D.M.; GREEN, D.R. Earlier distribution of phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition of overexpression of Bcl-2 and AB1. **J Exp Med**, v. 182, p. 1542–1556, 1995.
- MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Rev Bras Reprod Anim**, v.32, p.225-232, 2008.
- NOGUEIRA, É.; SILVA, A. S.; MARQUES JÚNIOR, H. R.; NOGUEIRA, R. J.; BORGES, J. C. Taxa de prenhez de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF no Planalto Boliviano. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011b. 5p. (Embrapa Pantanal. **Circular Técnica**, 101).
- NOGUEIRA, É.; SILVA, A. S.; DIAS, A. M.; ITAVO, L. C. V.; BATISTOTE, E. Taxa de prenhez de vacas Nelores submetidas a protocolos de IATF no Pantanal de MS. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011a. 6 p. (Embrapa Pantanal. **Circular Técnica**, 97).
- OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; BELETTI, M.E.; PERES, R.F.G.; OLIVEIRA, C.S.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. 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. **Livest sci**, v. 146, p. 38-46, 2001.
- ÕURA, C.; TOSHIMORI, K.; Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **Int rev citol**, v.122, p. 105-151, 1990.
- PAYAN-CARREIRA, R.; FONTBONNE, A.; MIR, F.; BORGES, P. **Molecular Markers in Sperm Analysis**. IntechOpen Ltd., London, UK; 2013
- PENÃ, F.J. Multiparametric flow cytometry: a relevant tool for sperm function evaluation. **Anim Reprod Sci**, v.12, p.351-355, 2015.
- PHILLIPS, N.J., MCGOWAN, M.R., JOHNSTON, S.D., MAYER, D.G. Relationship between thirty post-thaw spermatozoa characteristics and the field fertility of high-use australian dairy AI sires. **Anim Reprod Sci**, v.81, p.47-61, 2004.
- RAMALHO-SANTOS, J.; AMARAL, A.; SOUSA, A.P.; RODRIGUES, A.S.; MARTINS, L.; BAPTISTA, M.; MOTA, P.C.; TAVARES, R.; AMARAL, S. GAMBOA, S. Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy. In: Modern Research and Educational Topics in Microscopy. A Mendez-Villas and J Diaz (Eds.), 2007. Badajoz, Spain: p. 394-402.

- REVELL, S. G.; MRODE, R. A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Anim Reprod Sci**, v.36, p.77-86. 1994.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches. **In: Topics in bull fertility**. 2006.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reprod Fertil Dev.**, v. 9, p. 297-308, 1997.
- SAACKE, R.G.; NADIR, S.; NEBEL, R.L. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. **Theriogenology**. v.41, p. 45-50, 1994.
- SELLEM, E.; BROEKHUIJSE, M.L.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT, E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E.P. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. **Theriogenology**, v. 84, p. 1447-1454, 2015.
- SOUSA, A.P.; AMARAL, A.; BAPTISTA, M.; TAVARES, R.; CABALLERO CAMPO, P.; CABALLERO PEREGRÍN, P.; FREITAS, A.; PAIVA, ALMEIDA-SANTOS, T.; RAMALHO-SANTOS, J. 2011. Not all sperm are equal; functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. **Plos One**, 6:e18112.
- SUDANO, M.J.; CRESPILO, A.M.; FERNANDES, C.B.; MARTINS JUNIOR, A.; PAPA, F.O.; RODRIGUES, J.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Use of Bayesian inference to correlate in vitro embryo production and in vivo fertility in Zebu bulls. **Vet Med Intern**. Article ID: 436381, p.1–6. 2011.
- SUGULLE, A. H.; BHUIYAN, M. M. U.; SHAMSUDDIN, M. Breeding soundness of bulls and the quality of their frozen semen used in cattle artificial insemination in Bangladesh. **Livest Res Rural Develop**, v. 18, n. 4, p. 1-10, 2006.
- THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol Reprod**, v.56, p.991-998, 1997.
- THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biol Reprod**, v. 58, p. 786-793, 1998.
- UTT, M. D. Prediction of bull fertility. **Anim Reprod Sci** v. 169, p. 37- 44, 2016.
- WALTERS, A.H.; EYESTONE, W.E.; SAACKE, R.G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. **Theriogenology**, v. 63, p. 1925-1937, 2005.
- WILSON, H.R.; WARNICK, A.C.; GUTIERREZ, J.H. Differentiation of live from dead spermatozoa in cock semen. **Poult Sci**, v. 48, p. 714-717, 1969.
- WU, A.T.; SUTOVSKY, P.; MANANDHAR, G.; XU, W.; KATAYAMA, M.; DAY, B. N.; PARK, K.W.; YI, Y.J.; XI, Y.W.; PRATHER, R.S.; OKO, R. PAWP, a sperm-specific domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization. **J Biol Chem**, v. 282, p. 64–75, 2007.

ZHANG, B. R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M. G. H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. **Intern J Androl**, v. 22, n. 4, p. 253-260, 1999. doi: 10.1046/j.1365-2605.1999.00178.x.

CAPÍTULO 2

SEMEN QUALITY OF NELORE AND ANGUS BULLS CLASSIFIED BY FERTILITY INDEX AND RELATIONS WITH FIELD FERTILITY IN TIMED ARTIFICIAL INSEMINATION

Camile Sanches Silva¹; Walvonvitis Baes Rodrigues²; Margot Alves Nunes Dode³; Andriele Thainar Mendes Cunha⁷; Wagner Rodrigues Garcia¹; Breno Fernandes Barreto Sampaio⁶; Eliane Vianna da Costa-e-Silva⁶; Eriklis Nogueira^{1,4*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, FAMEZ/UFMS

² Médico Veterinário, Profissional liberal

³Embrapa Cenargen

⁴Embrapa Pantanal – Gado de Corte

⁶Docente da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

⁷ Universidade de Brasília, Instituto de Biologia Animal

Abstract: The objective of this work was to correlate the fertility indices of bulls with qualitative semen attributes. Semen doses of 28 bulls (Nelore and Angus) were used to evaluate sperm morphology and kinetics using conventional analysis, flow cytometry and computer analysis (CASA). The fertility index was effective to separate the bulls into different fertility classes ($P < 0.001$). Both cow category ($P < 0.001$) and BSC ($P < 0.005$) influenced fertility. After PLS analyses, four models were proposed with different variables. The complete model, including some cytometry and CASA analyzes, showed a higher correlation ($R^2 = 0.481$) with the sires fertility indexes, showing a positive effect of progressive motility, mean velocity (VAP, $\mu\text{m} / \text{s}$), membrane integrity and mitochondrial potential and negative effect on linear velocity (VSL, $\mu\text{m} / \text{s}$) and acrosomal integrity, demonstrating that these associated parameters can potentially predict bull fertility.

Key-words: flow citometry, CASA, sperm, pregnancy, Nelore cows.

Introduction

Artificial insemination (AI) is considered the most important biotechnology in the livestock production system, since it is the key tool to increase productivity by improving the genetic quality of the herd (SUGULLE et al., 2006). Even though the commercial development of artificial insemination at Timed artificial insemination (TAI) has improved significantly beef and dairy production, only 12% of the Brazilian bovine herd was inseminated last year (ASBIA, 2018).

The low use of this biotechnology in Brasil may be associated with the wide variation in the results. This variation is mainly due to factors inherent to the female

(e.g. postpartum anestrus and low body condition), to farm management (BÓ et al., 2003; BISINOTTO et al., 2012) and to the semen quality, such as sperm motility, plasma membrane integrity or inseminating dose concentration??? (CRESPILHO, 2007; OLIVEIRA et al., 2012).

Although artificial insemination using cryopreserved bovine semen represents the type of reproductive management more widespread in the global livestock production (FUERSTWALT et al., 2006), few technological advances have been achieved in recent 3 decades regarding the improvement of freezability rates of ejaculation, observing significant loss of fertilization potential of most of the cryopreserved samples. It is also well documented the difference in pregnancy rates when compared to conventional IA with heat detection and TAI, with lower results in up to 20% on the latter (SILVA et al., 2007; LUCY et al., 2001), or between bulls used in TAI, since with acceptable quality. So, Ability to predict male fertility is highly desirable for bulls used in TAI to achieve better conception rates, consequently reducing reproductive program costs.

The parameters routinely used to access the quality of frozen semen in Brazil include volume, sperm concentration, number of viable sperm in dose, progressive motility to thaw, and motility after the heat resistance test, besides the evaluation of sperm morphology (MANUAL, 1998). Although no evaluation technique taken alone provides sufficient sensitivity for the determination of fertility, the combination of the different methods is added to more accurately estimate the fertilization potential of bovine semen samples (MAZIERO et al., 2009). It is expected that the sperm fertility prediction is improved if additional parameters based on sperm functional characteristics are used, as the use of fluorescent media as markers for the integrity of the sperm membrane, hiposmotic test, evaluation of the integrity of the chromatin, or a combination among them, noting that a multifactorial analysis is more appropriate for diagnosis of the functionality and the structural integrity of sperm (LARSSON and RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000; PARKINSON, 2004). In general, in vitro tests performed to evaluate the potential fertilizing sperm, are representative only if they contain a high average intensity correlation with observed fertility rates in vivo.

Visualization of acrosome status via flow cytometry is another useful method for evaluating sperm quality, and spermatozoa acrosome integrity can be measured using

fluorescently labeled plant lectins, such as PNA and PSA, that bind to specific sperm surface glycans. PNA shows a high affinity and strong specificity for D-Gal a (1,3) D-GalNAc disaccharide as well as other disaccharides with a terminal galactose; as a result, it binds to the outer acrosomal membrane, which is exposed during sperm capacitation, acrosomal exocytosis, or acrosomal damage (Graham, 2001).

Automated assessment of sperm motility (CASA) is important due to the fact of sperm kinetics have relevance in determining the potential fertility of sperm (Arruda et al., 2011), but It is not quite clear yet which of the motion characteristics of sperm given by CASA system is able to predict fertility or fertilization rate. Despite the great current controversy regarding the correlation of sperm movement patterns with rates of fertility in vivo are significant differences in movement patterns played by sperm that reach high and low fertilization rates (VERSTEGEN et al., 2002).

Thus, an important aspect of improving the correlative power of in vitro sperm bioassays for field fertility involved the use of statistical modeling and the use of large sets of fertility data (UTT, 2016). In this way, we propose to correlate qualitative and quantitative sperm attributes with the fertility indexes of bulls with fertility extremes.

Material and Methods

Twenty-eight bulls of the Nelore and Angus breeds, classified by fertility index-IFERT™ (CRV Lagoa, São Paulo, Brazil) were selected to correlate the predicted fertility index with laboratory test results using conventional tests, computerized analysis and flow cytometry. For this study were added retrospective pregnancy data of 39.434 cows submitted to TAI protocols, as described in Fig 1.

Bull number	Number of inseminations	P/AI rate (%-Raw data)	IFERT™
15	70	30,0	-12,2
21	254	35,8	-10,4
11	747	28,3	-10,1
10	282	42,2	-6,4
22	350	37,4	-5,6
3	70	41,4	-3,8
5	225	46,2	-0,8

18	1177	45,7	0,3
23	1236	51,3	1,7
17	303	49,5	2,0
9	5130	50,5	2,1
27	1868	50,1	2,4
4	8078	50,3	2,9
26	651	47,2	2,9
19	1482	49,9	4,4
2	2355	49,3	5,1
16	803	52,3	5,3
6	1247	54,1	5,6
12	1562	44,6	6,0
20	25	56,0	6,0
8	499	65,1	7,4
24	503	60,0	7,5
14	4640	54,9	8,0
13	1833	52,9	8,4
7	1356	52,5	9,1
1	905	58,3	9,2
25	424	62,9	9,2
28	1359	60,1	12,4

Fig 1. Number of TAI, pregnancy rates (P/AI, %) of bulls classified by IFERT™

The IFERT™ is an index that combines reproductive components, obtained by statistical evaluations, provided by the commercial AI centre (CRV Lagoa), whose purpose is to predict the reproductive potential of the bulls when submitted to TAI programs. Currently, it contemplates the use of 814 breeding animals. It's a wide model of statistical evaluation that has careful filters to verify the "bull effect" in a more adjusted way. The IFert™ determines in percentage points the potential breeder design rate in relation to the average design rate obtained by the database of the FTAI's evaluated.

Sperm quality assessment

For the determination of sperm quality, three samples of each bull were used and evaluated for motility and vigor tests on thawing, concentration and morphological analysis, rapid thermo-resistance test (TRT), computer assisted sperm analysis (CASA) and flow cytometry, according to the methodologies described below.

Conventional analyzes

The evaluation of motility and vigor was obtained by deposition of one drop of semen on a heated slide (35 to 37°C) and covered by cover slip for observation under optical microscopy at 200x magnification, with motility values being expressed as a percentage (CBRA, 2013). The sperm concentration was determined in a hemocytometer at a dilution of 1:100, the result being expressed in sperm cells /ml (CBRA, 2013). After that, the value was divided by de straw volume to obtain the concentration per ml.

The morphology of the sperm cells was evaluated in a wet preparation and immersion phase contrast microscopewith a magnification of 1000x. For this analysis, abnormalities of head, middle piece and tail were considered by counting 200 cells, classifying them into major and minor defects. An aliquot of the vane was placed in a glass vial, sealed and kept in a water bath, to perform the rapid thermo-resistance test (TRT) at a temperature of 46°C for 30 minutes (CBRA, 2013). At the end of the period, the sample was analyzed for the following variables: total motility and vigor by the subjective method, under light field optical microscope.

Computer Analysis

The percentage of total and progressive motility assessments were performed through the Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA) system IVOS 12.3 (Hamilton-Thorne Bioscience®, Beverly, MA, USA) with a setup previously adjusted for the analysis of bovine spermatozoa, according to the manufacturer's instructions. For evaluation, 8µl of sperm was loaded into a pre-warmed Makler chamber (Makler, Santa Ana, CA, USA). At least three fields were selected manually for reading and analysis.

FlowSight Image Acquisition and Analysis

Fluorescence signals of sperm samples were done on AMNIS FlowSight® Image Cytometer (Amnis Corp., Seattle, WA) with INSPIRE V 6.1 acquisition software,

using 20 x magnification. Fluorescent dyes were excited by emission of 488 nm laser excitation at 10mW and 405nm laser excitation at 30mW. The signals emitted by green probes: FITC-PNA, MTGreen, AF488-AnV and YoPro1 were collected in Channel 2 (505–560 nm). The signals emitted by red probes such as PI and M540 were collected in Channel 4 (595–642 nm) and H33342 signals were collected in Channel 7 (435–505 nm).

Analyses of results were done based on dot plot graphs or histogram, and the positive or negative stain cells were determined from an unstained control samples. A compensation matrix was used for all evaluations composed with more than one fluorescent dye and a complete calibration of equipment was done at each time that the system was turnoff, according to the fabricant instructions. A total of 10.000 “single cells” events were collected per sample for each parameter evaluated.

Cell Staining

Fluorescence evaluations used a vital nuclear dye Hoechst 33342 (H33342) (bisBenzimide H33342 trihydrochloride) to differentiate sperm from non-sperm events. A solution was composed by 1µl of H33342 (5mg/ml) diluted in 2500µl of sodium citrate - 3% (HALLAP et al., 2006). In each 100µl of staining work solution 33µl of H33342 solution was added. To evaluations, in each analysis sperm samples were transferred to micro tubes containing 5µl of sample with 25µl of staining work solution composed by a fluorescent probes and then, were incubated for 10 to 20 min according to the dye recommendations at 37 °C of temperature.

Apoptosis assessment: Apoptosis detection was performed using kit “Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit” containing Annexin V conjugated with Alexa Fluor 488 (AF488-AnV) and Propidium Iodide (PI) solution (Molecular Probes V13241, Eugene, OR, USA). Analyses were performed according to kit guide recommendations. In the AF488-AnV+PI dot plots, the regions were set to differentiate alive and cell dead. For results analysis, dot-plots graphs were performed, for the gated cells. Sperm with intact membranes (negative for dyes); Sperm cell necrosis (PI positive); Sperm cell apoptosis (AF488-AnV positive) or as double positive (AF488-AnV positive and PI positive) indicate a late apoptotic/early necrotic, such as demonstrated on dot plot below (Fig 2).

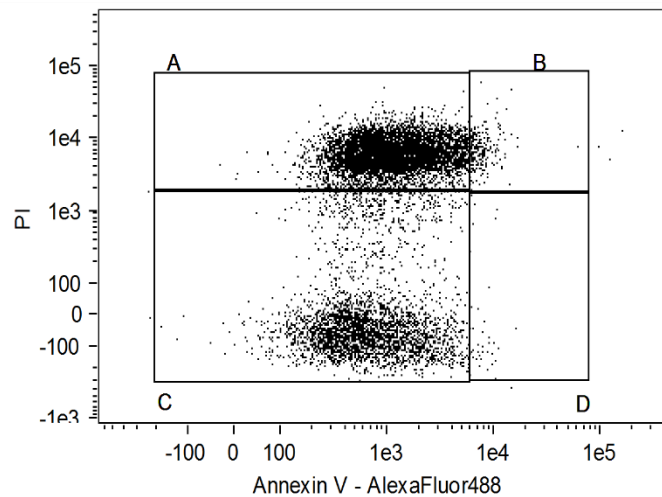


Fig 2. Representative dot plot of sperm stained with apoptosis assessments markers
A: Necrotic cells (PI positive and Annexin negative); B: Final apoptosis and initial necrotic cells (PI positive and Annexin positive); C: Whole cells (PI negative and Annexin negative); D: Initial apoptosis (PI negative and Annexin positive)

Acrosome status: The acrosome status was assessed using a fluorescent probe fluorescein isothiocyanate conjugated with peanut agglutinin (FITC-PNA) and PI (Molecular Probes P1304, Eugene, OR, USA) previously described (KLINC e RATH, 2007) with modifications. Staining work solution for acrosome assessment consisted of 100µl of sodium citrate (3%), 1µl of PI (0.5mg/ml), and 1.5µl FITC-PNA solution (100 mg/ml) using 10min of incubation. In the FITC-PNA + PI dot plots, the regions were set to differentiate viability and integrity of acrosome. Sperm with PI negative were considered alive, and PI positive were considered dead. Alive or dead cells were classified as acrosome-reacted (FITC-PNA positive), or as acrosome-intact (FITC-PNA negative), such as demonstrated in Fig 3.

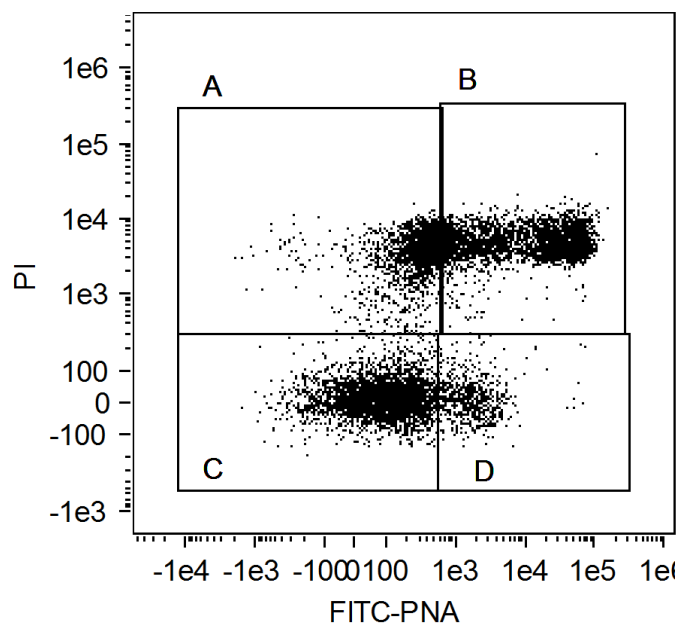


Fig 3. Representative dot plot of sperm stained with acrosome assessments markers

A: Dead cells with intact acrosome (PI positive and FITC-PNA negative); B: Dead cells with react acrosome (PI positive and FITC-PNA positive); C: Whole cells with intact acrosome (PI negative and FITC-PNA negative); D: Whole cells with react acrosome (IP negative and FITC-PNA positive).

Mitochondrial potential: The mitochondrial membrane potential was determined using MitoTracker Green (MTGreen) (Molecular Probes M7514, Eugene, OR, USA), prepared like Celeghini et al. (2007). Staining work solution was composed by 100µl of sodium citrate (3%) with 0.25µl of MTGreen (1mM) at 15 min of incubation. For this analysis, a histogram graph was used and the regions were set to differentiate cells with positive potential mitochondrial (MTGreen on midpiece positive) or no potential mitochondrial (MTGreen on midpiece absent).

Plasma membrane stability: Plasma membrane stability was assessed using Merocyanine 540 (M540) (Molecular Probes M24571, Eugene, OR, USA) associated with YoPro1 (Molecular Probes Y3603, Eugene, OR, USA) according to Hallap et al. (2006). Staining work solution was composed by 5ml of sodium citrate (3%), with 2.6µl of M540 (1mM) and 1µl of YoPro1 (25µM). In the YoPro1/M540 dot plots (Fig 5), the regions were set to differentiate stable membrane and unstable membrane.

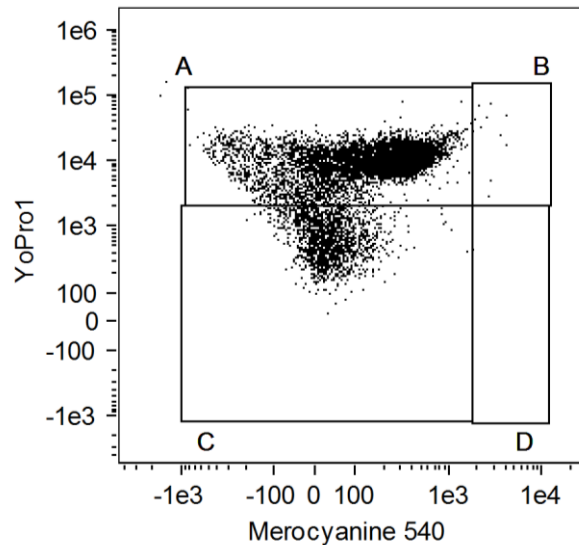


Fig 5. Representative dot plot of sperm stained with plasma membrane stability markers
A: Dead cells with stable membranes (YoPro1 negative and M540 negative); B: Dead cells with unstable membranes (YoPro1 negative and M540 positive); C: Whole cells with stable membranes (YoPro1 positive and M540 negative); D: Whole cells with unstable membranes (YoPro1 positive and M540 positive).

Statistics Analysis

Effects of index bulls fertility and semen quality data were analyzed using ANOVA (Proc GLIMMIX, SAS® 9.3, Inc., Cary, NC, USA) with $P < 0,05$ considered significant. The models included the bulls fertility (bottom, regular, superior, and elite), breed (Angus and Nelore- that was excluded from the final models) and the interaction. All values are reported as Least Square Means $\pm$ Standard Error (LSMEAN $\pm$ S.E.).

Multivariate data analysis i.e. Partial Least Squares Regression (PLS) that use the Wolds criterion was used to explore the relative importance of individual sperm variables related to fertility (P/AI) evaluating with four sets parameters: conventional model, cytometry, CASA and complete model, including all previous parameters.

Graphics with predictive values of pregnancy were created for the parameters of interest from the PLS, using the pregnancy as Y and respective sperm quality variable as X (PROC LOGISTIC, SAS® 9.3, Inc., Cary, NC, USA).

Results and discussion

The fertility index classes (bottom, regular, superior and elite) were effective to separate the bulls in different fertility patterns, such as showed in IFERT™ score ($P < 0.001$). This index also proved to be an effective predictor of the pregnancy rate

(Fig 6). Differences in the pregnancy rate found according to the fertility index classes of the bulls ($P<0.001$).

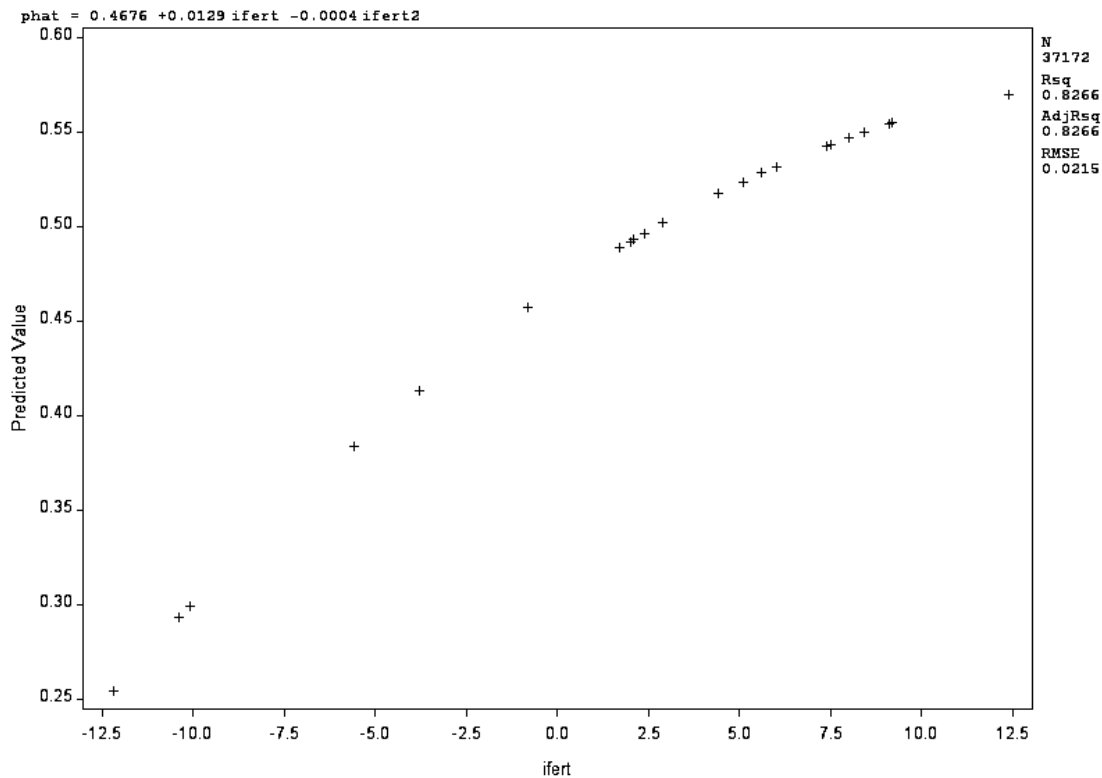


Fig 6. Predict value of pregnancy rate of bulls classified by IFERT TM

The category shows influence ($P<0.001$) on the pregnancy rates of bovine females, so that multiparous cows had higher P/AI (51.86%), non-lactating cows had intermediate (48.98%), heifers and primiparous demonstrated lower results (47.19 and 45.12, respectively) such as described by several studies (PFEIFER et al., 2007; BRAUNER et al., 2008; GRILO et al., 2015).

Thus, in this study, differences in pregnancy rates by category and according to the bulls fertility classes were observed (Fig 7), except for the primiparous ones. It can be explained by low reproductive response of this category, resulting from the combined effects between the growth and increased nutritional requirements during the first lactation (PILAU e LOBATO, 2009). Regarding to P/AI in different category and fertility classes, bulls classified as bottom, present lower P/AI in all category.

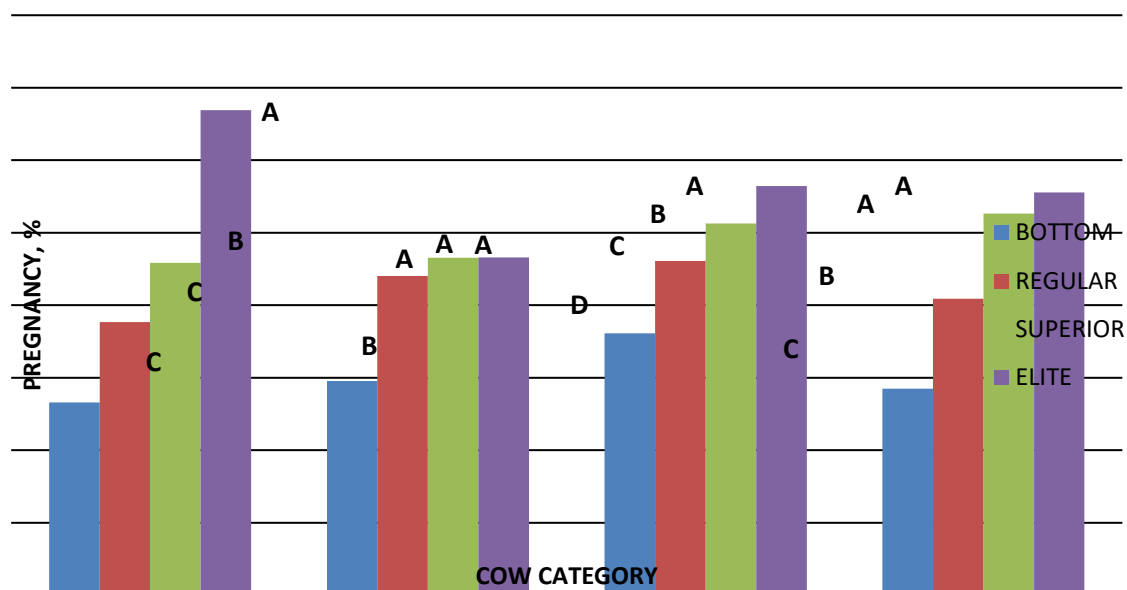


Fig 7. Pregnancy rate by cow category and bull fertility. Different letters in the same cow category differ from each other by Tukey test ($P < 0.05$).

The body condition score (BCS) has a direct influence on fertility, because the nutrients are directed for cow and calf. Only after these requirements are suppressed, the nutrients are offered for the reproduction of the species (FREITAS JÚNIOR et al., 2008). The data presented in Fig 8 showed that elite bulls maintain their higher pregnancy independent of BCS (except in cows with BCS higher than 4), but this behavior is more evident in cows with lower BCS.

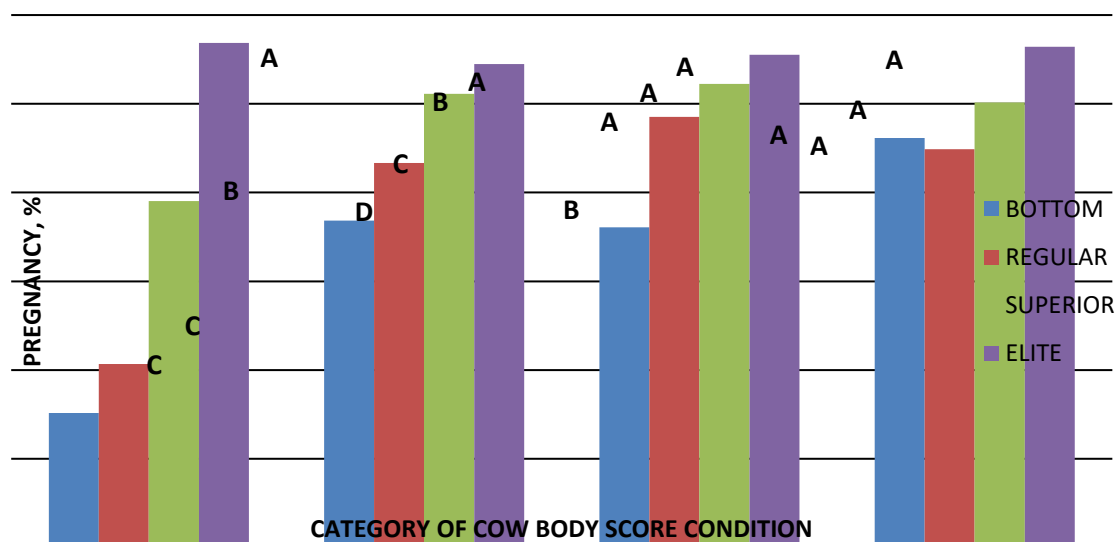


Fig 8. Pregnancy rate by category of body score condition (BSC) and bull fertility. Different letters in the same BSC differ from each other by Tukey test ($P < 0.05$).

Descriptive statistics were computed for all parameters, including pregnancy rate, fertility index and all seminal analysis. The differences in sperm functional attributes evaluated among four bull fertility categories (bottom, regular, superior, elite) are given in the Table 1.

Table 1. Descriptive statistics of bull semen quality parameters, obtained with conventional analysis, computer-assisted semen analyzed system (CASA) and flow cytometry

TRAITS	IFERT INDEX					
	BOTTO M	REGULAR	SUPERIOR	ELITE	SE	P
Number of bulls	5.00	5.00	9.00	9.00	-	-
Inseminations	1998	25892	7500	4044	-	-
Pregnancy rate, %	34.74 ^c	45.85 ^b	50.35 ^b	57.68 ^a	1.21	< 0.001
Ifert, points	-8.94 ^d	-1.43 ^c	3.60 ^b	8.32 ^a	0.63	< 0.001
Motility, %	40.00	36.66	33.50	36.00	1.65	0.185
Vigor (1-5)	3.40	3.00	3.40	3.45	0.15	0.579
Motility post thermal resistance test (TRT), %	11.00	11.66	16.50	14.00	2.12	0.448
Vigor post thermal resistance test (TRT)	2.00	2.66	2.75	2.60	0.25	0.400
Total defects, %	14.6 ^a	9.67 ^{ab}	10.3 ^{ab}	7.4 ^b	1.85	0.050
Major defects, %	13.2 ^a	8.67 ^{ab}	8.4 ^{ab}	5.4 ^b	1.70	0.060
Minor defects, %	1.40	1.00	1.90	2.00	0.46	0.696
Total concentration, sperm 10 ⁶ / ml	65.12	62.13	56.25	58.5	0.91	0.077
Flow Cytometry						
Cells with positive potential mitochondrial, % (Polariz)	43.56	58.01	63.76	58.22	6.38	0.271
Sperm with intact membranes, % (membrane integrity -Intalex)	36.66	32.22	31.48	41.68	5.11	0.558
Sperm (dead and live) with acrosome intact %	76.55	59.55	56.37	65.83	5.79	0.173
Live sperm with acrosome reacted, % (liverafitcpna)	46.60 ^a	23.82 ^b	25.18 ^b	30.46 ^{ab}	4.15	0.019
Dead Sperm, % (M540)	67.23 ^{ab}	88.98 ^a	78.17 ^{ab}	68.71 ^b	4.32	0.042
Live sperm with stable membrane, % (M540)	32.52 ^a	10.6 ^b	21.73 ^{ab}	31.28 ^a	3.98	0.030
Computer Analyze (CASA)						
Total Motility, %	57.01	53.50	64.70	70.33	4.73	0.153
Progressive Motility, %	28.20 ^b	28.50 ^b	40.02 ^a	44.77 ^a	2.87	0.006
Pathway Velocity (VAP), µm/s	64.97 ^b	69.37 ^b	76.56 ^a	78.68 ^a	2.10	0.004
Straightline Velocity (VSL), µm/s	49.74 ^c	54.77 ^{bc}	59.77 ^{ab}	61.99 ^a	1.78	0.026
Linearity (LIN), %	44.20	46.50	46.20	48.11	1.64	0.482
Straightness (STR), %	76.80	79.25	77.80	78.30	1.29	0.828
Amplitude Lateral of Head (ALH), µm	6.36	6.05	6.61	6.29	0.26	0.598
Curvilinear Velocity (VCL), µm/s	116.72 ^b	120.85 ^{ab}	134.61 ^a	133.25 ^a	4.21	0.050

Significant differences were observed between different fertility index for these parameters (P<0.05).

The seminal parameters measured and described in Table 1 were subjected to

PLS. This analysis revealed components whose value was highly correlated with the pregnancy rate and index fertility. In this way, were proposed four prediction models of the fertility value, such as showed in Fig 9.

ANALYSES	Parameters	R ²	MODELS
Conventional	Motility post thermal resistance test (MOTTRT), Major defects (MDEFECTS)	0.154	$P(\%) = 49.781 + (0.243 \text{ MOTTRT}) - (0.483 \text{ MDEFECTS})$
Casa	Progressive motility (PROG), pathway velocity (VAP), straightline velocity (VSL)	0.380	$P(\%) = 9.788 + (0.200 \text{ PROG}) + (0.289 \text{ VAP}) + (0.179 \text{ VSL})$
Flow Cytometry	Mitochondrial activity (POLARIZ), membrane integrity (INTALEX), reacted acrosome (LIVERAFITCPNA)	0.259	$P(\%) = 44.059 + (0.101 \text{ POLARIZ}) + (0.273 \text{ INTALEX}) - (0.343 \text{ LIVERAFITCPNA})$
Complete – all parameters	Progressive motility (PROG), pathway velocity (VAP), straightline velocity (VSL), mitochondrial activity (POLARIZ), reacted acrosome (LIVERAFITCPNA), membrane integrity (INTALEX)	0.481	$P(\%) = 36.18 + (0.602 \text{ PROG}) + (0.208 \text{ VAP}) - (0.440 \text{ VSL}) + (0.125 \text{ POLARIZ}) - (0.341 \text{ LIVERAFITCPNA}) + (0.097 \text{ INTALEX})$

Fig 9. Prediction models of the fertility value

In the conventional model ($R^2 = 0.154$) major defects showed a negative correlation with the predicted values of pregnancy (Fig 10). These results have also been found in Brazil (FRENEAU et al., 2017) and Australia, showing that sperm morphology was the isolated trait that had greater repeatability and relation with the number of calves produced by bull, among the tests performed during the andrological evaluation (FITZPATRICK et al., 2002; HOLROYD et al., 2002). This model also showed a positive correlation of post TRT motility with field fertility, which according to Dimitroupolos (1967), would justify the good acceptance of the test.

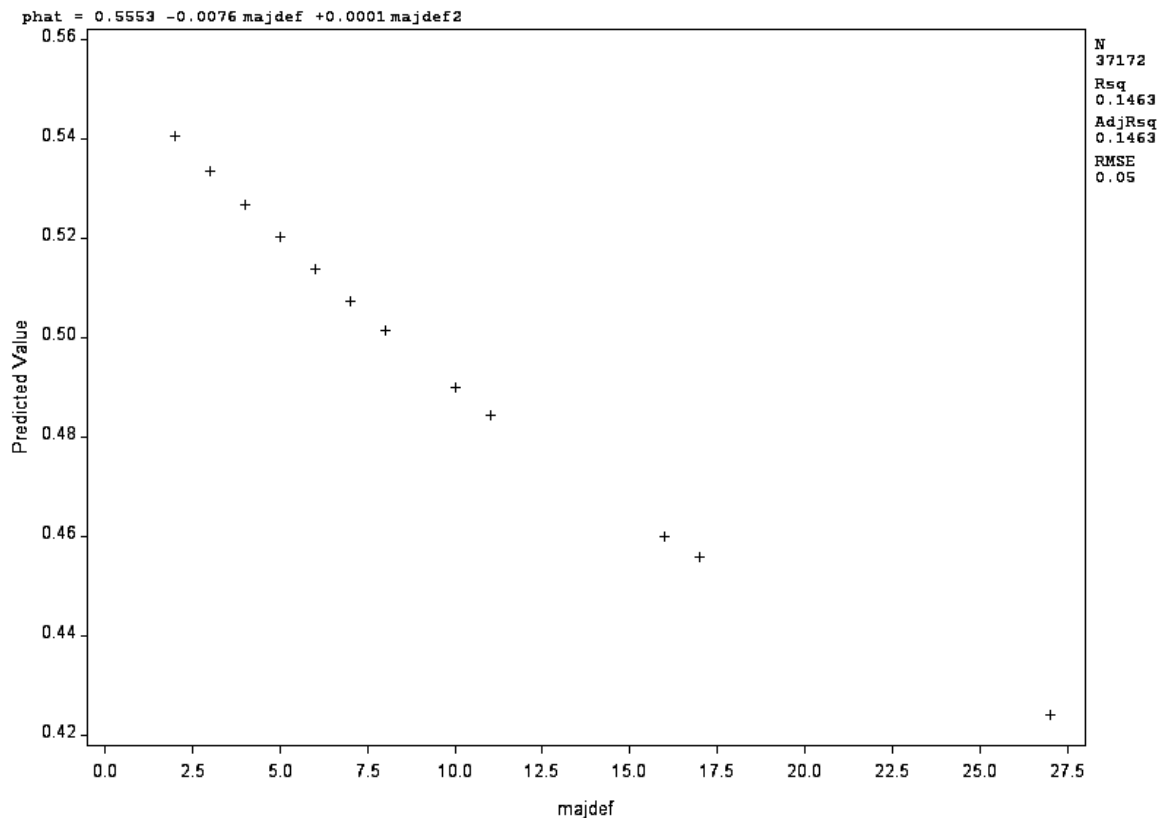


Fig 10. Logistic regression – Major defects and Predict value of P/AI

The Casa model ($R^2 = 0.380$) showed a positive correlation of the progressive motility (Fig 11), VAP (Fig 12) and VSL (Fig 13) with the predict value of P/AI, thus, higher velocities are associated with better fertility index. Similar results were found by Cseh et al. (2003) whose data indicate that bulls with lower VCL, VSL and VAP values showed lower fertilization rates. After evaluating the individual sperm velocities (VCL, VSL and VAP), Nagy et al. (2015) observed that VAP presented a higher correlation with the rates of non-return to estrus at 30 and 75 days ($R^2 = 0.7029$ and 0.6652 , respectively), suggesting that this is the parameter of sperm velocity with greater clinical relevance to predict fertility.

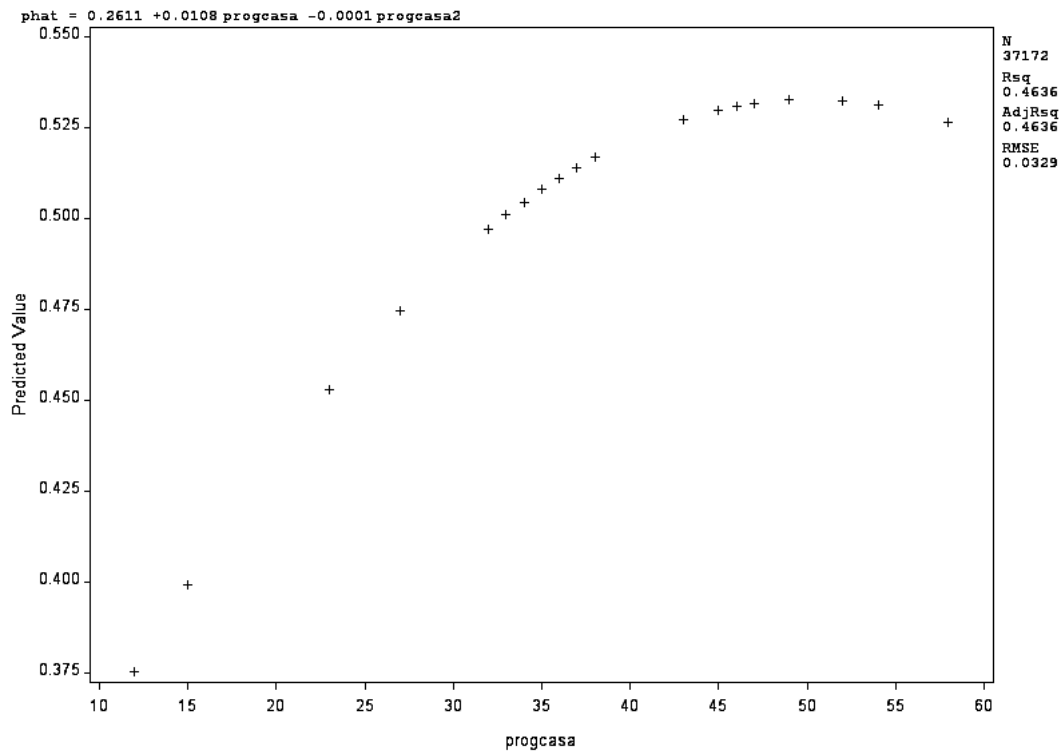


Fig 11. Predict value of pregnancy rates by progressive motility / CASA

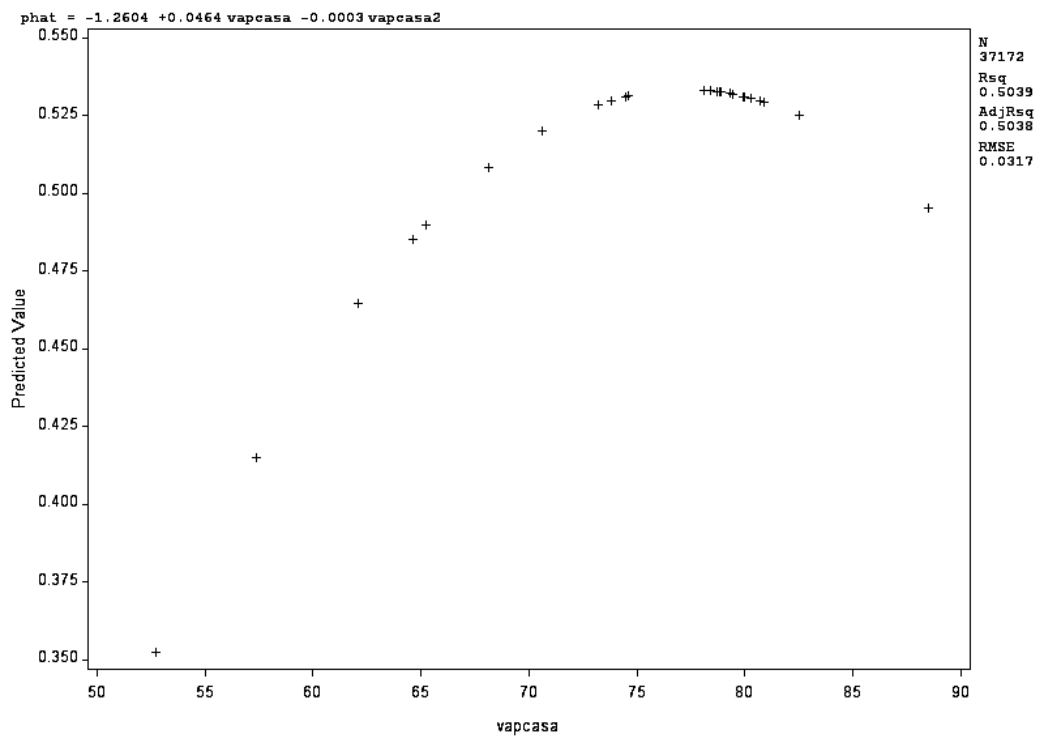


Fig 12. Predict value of pregnancy rates by average pathway velocity (VAP; μ /s) - CASA

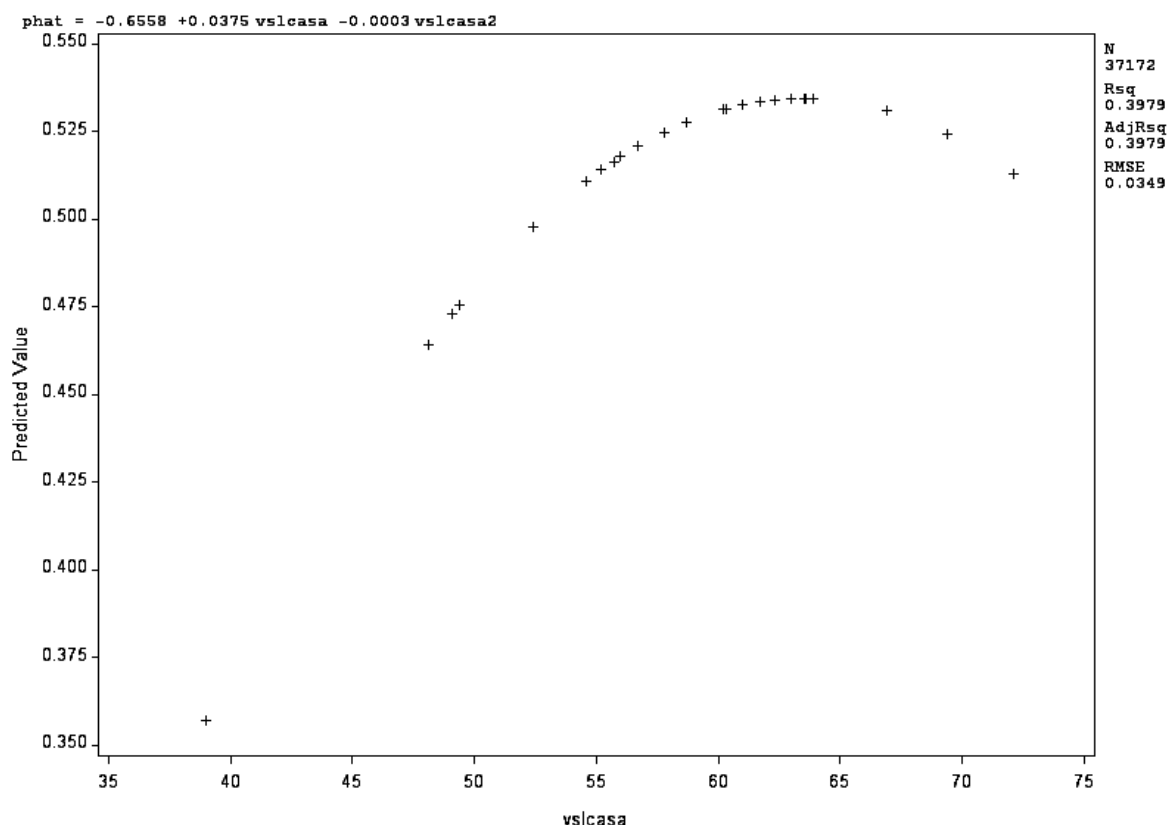


Fig 13. Predict value of pregnancy rates by straight line velocity (VSL; μ/s) - CASA

The Flow cytometry model explained 25.9% of the observed variation in fertility. The important variable in these results were mitochondrial potential status, acrosome and membrane integrity, such as described in Fig 9.

The plasma membrane plays a key role in the spermatozoa survival in the female reproductive tract and in the maintenance of their fertilization capacity, acting as a barrier between the components of the intracellular and extracellular environment (CUNHA et al., 2015). Thus, an intact and functionally active membrane is extremely important to ensure good fertility rates in bulls. This proposition is agreement with Brito et al. (2003), which evidences the necessity of intact membranes for the spermatic capacity, acrosome reaction and oocyte penetration.

The data show (Fig 14) that the percentage of cells with positive potential mitochondrial higher than 40% are correlated with better fertility indexes, since de mitochondrial functionality is correlated with sperm motility and viability (YOON et al.,

2015) and it is possibly associated with the fact that mitochondrial healthy have a higher membrane potential (SOUSA et al., 2011).

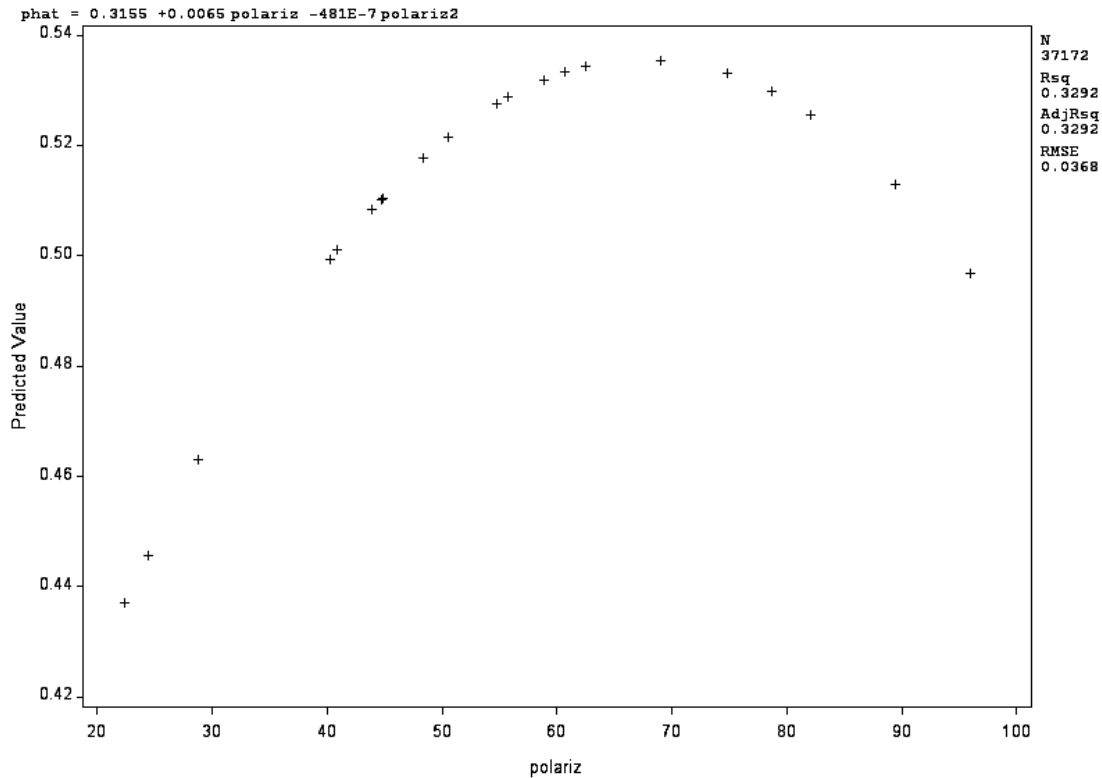


Fig 14. Predict value of mitochondrial potential (%) by flow cytometry.

The multivariate analysis demonstrated by the complete model ($R^2 = 0.481$) identified six sperm attributes that contributed to fertility. First, membrane integrity already considered by several authors as a potential fertility marker (JANUSKAUSKAS et al., 2003; PUGLISI et al., 2010; CHRISTIANSEN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014). In addition to this characteristic, the importance of the acrosome functionality and the mitochondrial activity for sperm fertility was too evidenced, such as demonstrated by Oliveira et al. (2014) when correlating plasma membrane integrity, acrossomal integrity and mitochondrial function with the pregnancy rate in Nelore cows.

Regarding spermatic kinetics, multiple parameters have been shown to be significant for fertilization, corroborating the results found by Oliveira et al. (2013). These analyses demonstrating that models with higher numbers of parameters can

improve the fertility prediction in TAI programs, but these results still lack field validation.

Conclusions

The complete model including parameters of CASA (progressive motility, progressive and straightline velocity), and cytometry (mitochondrial potential, membrane and reacted acrosome), improve the fertility prediction of sperm samples used in TAI.

Bulls classified by fertility indexes maintain the dispersions of pregnancy rates in different categories, BCS classes and the seminal pattern is consistent with such classification.

References

- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A. *et al.* Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.35, n.2, p.145-151, 2011.
- ASBIA - Associação brasileira de inseminação artificial. Índex ASBIA- importação, exportação e comercialização de sêmen - 2017. Disponível em: www.asbia.org.br. Acesso em: 19 de outubro de 2018.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 78, n. 3-4, p. 307- 326, 2003. doi: 10.1016/S0378-4320(03)00097-6.
- BRAUNER, C.C.; PIMENTEL, M.A.; LEMES, J.S.; PIMENTEL, C.A.; MORAES, J.C.F. Reprodução de vacas de corte em lactação e solteiras submetidas à indução/sincronização de estro. **Cienc Rural**, v. 38, p. 1067-1072, 2008.
- BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAUGOESEELS, S.; PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1539-1551, 2003.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3 ed. Belo Horizonte, CBRA, 2013.
- CELEGHINI, E.C.; DE ARRUDA, R.P.; DE ANDRADE, A.F.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reprod Domest Anim** 42: 479-488, 2007.
- CHRISTIANSEN, P.; LABOURIAU, R.; BIRCK, A.; BOE-HANSEN, G.B.; PEDERSEN, J.; BORCHERSEN, S., 2011. Relationship among seminal quality measures and field fertility of young dairy bulls using low-dose inseminations. **J Dairy Sci**, v. 94, p. 1744–1754, 2011.

- CRESPILO, A.M. Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo-fixado (IATF). 2007. 124f. **Dissertação** (Mestrado, Área de Concentração: Reprodução Animal) – FMVZ/ UNESP, Botucatu.
- CSEH, S.; POLICHRONOPOULOS, T.; SOLTI, L. (2003). Prediction of bull fertility by computer assisted semen analysis. **Reprod Fert Develop**. V.16, p. 128-129.
- CUNHA, A.T.M.; CARVALHO, J.O.; DODE, M.A.N.; Techniques for sperm evaluation using fluorescent probes. **Semina**, v. 36, nº 6, Supl 2, p. 4365 – 4376, 2015.
- DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperme congelé. **Anim Med Vet**, v.4, p.215-224, 1967.
- FITZPATRICK, L.A.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M.R.; BERTRAM, J.D.; DOOGAN, V.J.; DE FAVERI, J.; MILLER, R.G.; HOLROYD, R.G. Bull selection and use in northern Australia. Part 2. Semen traits. **Anim Reprod Sci**, v.71, p.39-49, 2002.
- FREITAS JÚNIOR, J. E., DE ROCHA JÚNIOR, V. R., RENNÓ, F. P., MELLO, M. T. P., DE CARVALHO, A. P., & DE CALDEIRA, L. A. (2008). Efeito da condição corporal ao parto sobre o desempenho produtivo de vacas mestiças Holandês × Zebu. **Rev Bras Zootec**, 37, 116–121. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008000100017>
- FRENEAU, G.E.; PUOLI, J.R.; ARNHOLD, E. Evolução após quatro anos de aplicação da capacidade andrológica por pontos (CAP) em touros nelore e estudo da relação com a prenhez em estação de acasalamento. **Cienc Anim Bras**, Goiânia, v.18, 1-12, e-31274, 2017.
- GRAHAM JK. Assessment of sperm quality: A flow cytometric approach. **Anim Reprod Sci** 68:239247, 2001.
- GRILLO, G. F.; GUIMARÃES, A. L. L.; COUTO, S. R. B.; ABIDU-FIGUEIREDO, M.; PALHANO, H. B. Comparação da taxa de prenhez entre novilhas, primíparas e múltiparas da raça Nelore submetidas à inseminação artificial em tempo fixo. **Rev Bras Med Vet**, v. 37, n. 3, p. 193-197, 2015.
- HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U., et al. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology** 65: 1122-1136, 2006.
- HOLROYD, R.G.; DOOGAN, V.J.; DE FAVERI, J.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M.R.; BERTRAM, J.D.; VANKAN, D.M.; FITZPATRICK, L.A.; JAYAWARDHANA, G.A. MILLER, R.G. Bull selection and use in northern Australia 4: Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. **Anim Reprod Sci**, v.71, p.67-79, 2002.
- HOLROYD, R.G.; DOOGAN, V.J.; DE FAVERI, J.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M.R.; BERTRAM, J.D.; VANKAN, D.M.; FITZPATRICK, L.A.; JAYAWARDHANA, G.A.; MILLER, R.G. Bull selection and use in northern Australia 4: Calf output and

- predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. **Anim Reprod Sci**, v.71, p.67-79, 2002.
- KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reprod Domest Anim**. 42: 63-67, 2007.
- LARSSON, B., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? **Anim Reprod Sci**, v.60/61, p.327-336, 2000.
- LUCY, M. C.; BILLINGS, H. J.; BUTLER, W. R. et al. Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF2 α for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows, peripubertal beef heifers, and dairy heifers. **J. Anim. Sci.** v.. 79, p. 982–995, 2001.
- MANUAL** para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.
- MAZIERO, R.R.D.; CRESPILO, A.M.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P., DELL'AQUA JUNIOR, J.A., PAPA, F.O. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. **Rev Bras Reprod Anim Supl**, n.6, p.5-10, dez. 2009.
- NAGY, Á.; POLICHRONOPOULOS, T.; GÁSPÁRDY, A.; SOLTÍ, L.; CSEH, S. 2015. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. **Acta Vet Hung**, v. 63, p.370–381, 2015.
- OLIVEIRA, B.M., ARRUDA, R.P., THORNÉ, H.E., FILHO, M.M., OLIVEIRA, G., GUIMARÃES, C., NICHE, M., SILVA, L.A., CELEGHINI, E.C.C., 2014. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. **Theriogenology** 82, 767–772.
- OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; BELETTI, M.E.; PERES, R.F.G.; OLIVEIRA, C.S.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. 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. **Livest sci**, v. 146, p. 38-46, 2001.
- OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; CELEGUINI, E.C.C.; SANTOS, R.M.; BELETTI, M.E.; PERES, R.F.G.; MONTEIRO, F.M.; LIMA, V.F.H. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Anim Reprod Sci**, v.137, p.145–55, 2013.
- PARKINSON, T.J. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. **Vet J**, v.168, p.215–229, 2004.
- PFEIFER, L.F.M.; VARELA, A.S.; FONTOURA JR, J.A.S.; SCHNEIDER, A.; CORREA, M.N.; DIONELLO, N.J.L. Efeito da condição corporal avaliada no diagnóstico de gestação sobre o momento da concepção e taxa de prenhez em vacas de corte. **Acta Scient Vet**, 35:303-307, 2007.
- PILAU, A.; LOBATO, J.F.P. Desenvolvimento e desempenho reprodutivo de vacas primíparas aos 22/24 meses de idade. **Rev Bras Zootec**, 38:728-736, 2009.

- PUGLISI, R., KRVAVAC, L., BONACINA, C., GALLI, A., 2010. In vitro competitive binding index using fluorochrome-labelled spermatozoa for predicting bull fertility. **Zygote**, v. 8, p. 281–291.
- SILVA, A.S.; COSTA E SILVA, E.V., NOGUEIRA, É., CA; ZÚCCARI, C.E.S.N. Avaliação do custo/benefício da inseminação artificial convencional e em tempo fixo de fêmeas bovinas pluríparas de corte. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, n.4, p.443-455, 2007.
- SOUSA, A. P.; AMARAL, A.; BAPTISTA, M.; TAVARES, R.; CABALLERO CAMPO, P.; CABALLERO PEREGRÍN, P.; FREITAS, A.; PAIVA, A.; ALMEIDA-SANTOS, T.; RAMALHO-SANTOS, J. Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. **PLoS One**. 2011 6:e18112. doi:10.1371/journal.pone.0018112.
- SUGULLE, A. H.; BHUIYAN, M. M. U.; SHAMSUDDIN, M. Breeding soundness of bulls and the quality of their frozen semen used in cattle artificial insemination in Bangladesh. **Livest Res Rural Develop**, v. 18, n. 4, p. 1-10, 2006.
- UTT, M. D. Prediction of bull fertility. **Anim Reprod Sci**, v. 169, p. 37 – 44, 2016.
- VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, OCLIN K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.
- YOON, S. J.; KWON, W. S.; RAHMAN, M. S.; LEE, J. S.; PANG, M. G. A novel approach to identifying physical markers of cryo-damage in bull spermatozoa. **PLoS One**, v. 10, p. 1-12, 2015

CAPÍTULO 3

QUALITY OF CRYOPRESERVED NELORE OR ANGUS BULLS SEMEN AND PREGNANCY OF BOVINE FEMALES IN TAI PROGRAMS

QUALIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE TOUROS NELORE OU ANGUS E PREENHEZ DE FÊMEAS BOVINAS EM PROGRAMAS DE IATF

Camile Sanches Silva¹; Wagner Rodrigues Garcia¹; Walvonvitis Baes Rodrigues²; José Roberto Potiens³; Juliana Corrêa Borges Silva⁴; Eduardo Antonio de Almeida Rossignolo^{2*}; Fernanda Battistotti Barbosa⁶; Breno Fernandes Barreto Sampaio¹; Eliane Vianna da Costa-e-Silva¹; Eriklis Noqueira^{1,4*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, FAMEZ/UFMS E-mail: medvetcamile@gmail.com

² Médico Veterinário, Profissional liberal

³Médico Veterinário, Seleon Biotecnologia

⁴Embrapa Pantanal – Gado de Corte

⁵Acadêmico de graduação em Medicina Veterinária / UFMS

⁶ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFMS

Abstract: This work evaluated the pregnancy rates (P/AI) of Angus and Nelore bulls in two distinct biomes, Pantanal and Cerrado of Mato Grosso do Sul, in addition to correlating different methods of laboratory evaluation of post-thawing semen with the pregnancy rate of zebu cows submitted to TAI protocols, through logistic regression analysis between pregnancy and individually assessed parameters. Were used 20 bulls (10 Nelore and 10 Abeerden Angus) and 1542 Nelore cows, in two different farms. Physical, functional and morphological analyzes were performed by conventional methods, computer assisted sperm analysis (CASA) and flow cytometry. P/AI were higher in the Cerrado then in Pantanal ($P = 0.003$). Pregnancy rate among bulls ranged from 22.9 to 59.4% ($P = 0.016$) and varied by breed, being higher with Nelore bulls semen (53.09%) than Angus (47.5%, $P = 0.037$), however, there wasn't interaction between breed and biome. In relation to the seminal quality variables, was observed effect of total and major defects, VAP (progressive velocity), curvilinear velocity (VCL), linearity (LIN), straightness (STR) and amplitude lateral of head displacement (ALH) over probability of Nelore cows submitted to TAI protocols. Comparing the conditions proposed, the bull breed and the biome exert a considerable influence on P/AI rates and the evaluation of semen is important to identify samples with greater fertilizer potential.

Key-words: beef cattle, laboratory analyze, reproduction

Resumo: Este trabalho avaliou as taxas de prenhez à IATF de touros Angus e Nelore, no Pantanal e Cerrado do Mato Grosso do Sul, além de correlacionar diferentes métodos de avaliação laboratorial de sêmen pós-descongelamento com a taxa de prenhez de vacas zebuínas submetidas a protocolos de IATF, através de análises de

regressão logística entre a prenhez e os parâmetros avaliados individualmente. Foram utilizados 20 touros (10 Nelore e 10 Aberdeen Angus) e 1542 vacas Nelore, alocadas em duas fazendas distintas. Foram realizadas análises físicas, funcionais e morfológicas por métodos convencionais subjetivos, análise computadorizada de sêmen (CASA) e citometria de fluxo. As taxas de prenhez à IATF foram maiores no Planalto em relação ao Pantanal ($P=0.003$). A taxa de prenhez entre touros oscilou de 22,9 a 59,4% ($P=0,016$) e variou por raça, sendo maior com sêmen de touros Nelore (53,09%) do que Angus (47,5%, $P=0.037$), entretanto, não houve interação entre raça e bioma. Em relação às variáveis de qualidade seminal, observou-se efeito de defeitos totais e maiores, VAP (velocidade progressiva), velocidade curvilínea (VCL), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e amplitude lateral de cabeça (ALH) sobre a probabilidade de prenhez de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF. Conclui-se que nas condições propostas, a raça do touro e o bioma exercem considerável influência nas taxas de prenhez à IATF e que a avaliação de sêmen é importante para identificar amostras com maior potencial fertilizante.

Palavras-chaves: Análise laboratorial, gado de corte, reprodução,

Introduction

The Pantanal is a flood plain and represents the most preserved Brazilian biome, with extensive development of livestock, predominantly of the breeding activity, in extensive natural systems and with handling characteristics guided by the flood regime (POTT et al., 1988). In this system, the animals receive little care, being kept almost exclusively of pastures native to the extensive sandy plains and with few subdivisions, to allow the selective grazing and the use of watering. This fact can explain, in parts, the low zootechnical performance of the Pantanal, with low birth and weaning rates (around 58% and 42%). The introduction of technologies such as TAI brings rapid return on productivity, even in extensive systems such as the Pantanal (ABREU et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2011a).

The accurate prediction of bull fertility on field have major economic importance because TAI using semen with low fertilizing capacity represents a significant loss to the breeding industry. Despite several attempts to identify markers, methods or tests that could aid in predicting bull fertility the results are inconsistent and further research is needed (RODRÍGUEZ-MARTINEZ, 2013).

The quality rate of the cryopreserved program on P/AI rate is expressive, although is used the samples submitted to simple laboratory tests and that meet minimum standards of quality (ANDERSON et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2011a,b). Although the sperm cryopreservation methodology has become a standard procedure

in the reproductive biotechnology industry, its recognized that most of the protocols used result in considerable amounts of spermatozoa that don't survive processing or fail at some stage of fertilization (NAGY et al., 2004).

Also, Sudano et al. (2011) mentions that success in TAI programs depend largely on semen quality and better P/AI rates can be achieved using high fertility animals. Would be interesting to identify variables in the frozen semen that can predict the fertility of cows submitted to TAI.

Researches have already specifically explored the relation between the semen samples quality in relation to P/AI with inconclusive results (OLIVEIRA et al., 2012), but correlations between just one variable and fertility were found, but it isn't a reliable prediction (SELLEM et al., 2015), although moderate correlation could be obtained for some parameters. So, combining several variables has been suggested to be more relevant for creating a reliable fertility predictor (PUGLISI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

Thus, the objective was correlate different methods of seminal evaluation with P/AI rate of *Bos indicus* cows submitted to TAI protocols in two different biomes using Nelore and Angus bulls.

Material and Methods

Semen straws were selected from 20 bulls (10 Nelore and 10 Angus), used in TAI protocols in multiparous Zebu cows (*Bos indicus*) of properties located in the Cerrado and Pantanal sul-matogrossense. Reproductive data of females were added to the work to correlate the P/AI rate with the results obtained in laboratory tests.

Biomes

Pantanal is a biome known to be the largest flooded area on the planet, covering almost 2% of the Brazilian territory, occupying part of the states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, as well as part of the territories of Bolivia and Paraguay. The climate is characterized by alternation between periods of heavy rainfall (October to March) and periods of drought (April to September). The sandy and loamy soil, associated with the low slope and the many rivers of the region, contribute to the

formation of extensive wetlands, that are used for livestock, even with lower productive and / or reproductive rates.

The Cerrado occupies 22% of the national territory, being the second largest biome in South America. It has a seasonal tropical climate with dry winter, an acidic latosol and high aquifer potential, favoring biodiversity. Em função das suas características de solo, clima e inundação, as áreas localizadas na planície Pantaneira possuem qualidades distintas das localizadas no planalto. In reference of livestock, the properties of the lowland have their main livestock breeding activity, while the properties located on the plateau perform either the rearing phase, the ingestion or even the same complete cycle (OLIVEIRA et al., 2016)

Artificial insemination in fixed time

The TAI protocol was:

Cows at random stages of the estrous cycle, received an intravaginal progesterone-releasing device (1g progesterone, Sincrogest®, Ouro Fino, São Paulo, Brazil) plus 2 mg I.M. of estradiol benzoate (EB; Estrogin®, Biofarm, São Paulo, Brazil) on Day 0. The Sincrogest devices were removed on Day 8, and all cows received 0.150 mg I.M. of d-cloprostenol (PGF₂α-analogue; Prolise®, Arsa, Buenos Aires, Argentina), 300 IU of eCG (Novormon®, Zoetis, São Paulo, Brazil) I.M. and 0.5 mg of estradiol cypionate (ECP®, Zoetis, São Paulo, SP) I.M.

On Day 8 all cows were marked in the sacral and tail head region with chalk (Raidl-maxi, Raidex GmbR, Dettingen/Erms, Germany). On Day 10, the estrus expression, assessed at the time of TAI, was classified according to the proportion of tail chalk removed: HEATSC 1: no or few chalk removal (no estrus expression), HEATSC2: partial chalk removal (low estrus expression) and HEATSC3: near complete or complete removal of chalk (high estrus expression; NOGUEIRA et al., 2016). After that, the cows were submitted to TAI, carried out by five inseminators of proven experience, using thawed semen in automatic defroster to 36°C. The pregnancy diagnostic was obtained by transrectal ultrasound, 30 days after TAI.

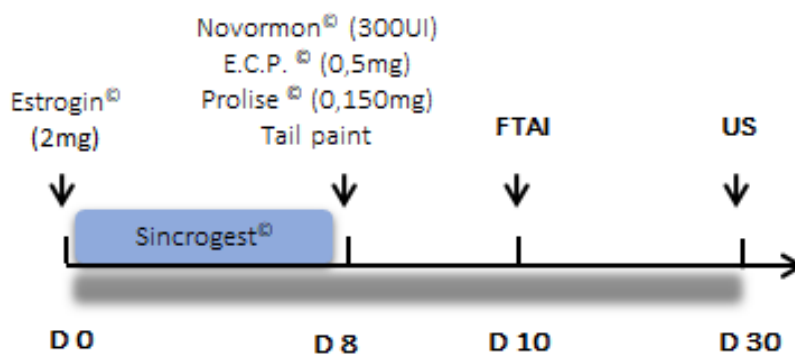


Fig 1. Fixed-time artificial insemination program (FTAI)

Evaluation of semen quality

For determination of sperm quality were carried out the motility and vigor tests post thawing, concentration and morphological analysis of frozen semen, rapid thermoresistance test (TRT), computer assisted sperm analysis (CASA) and flow cytometry, in accordance with the methodologies described below.

The assessment of motility and vigor, made on the time of collection was obtained through the deposition of a drop of semen on heated blade (35 to 37°C) and covered with laminate for observation in optical microscopy with 20x increase, being the motility values expressed as a percentage (CBRA, 2013). The spermatic concentration was determined in hemocytometer, in the dilution of 1:100, being the result expressed in sperm cells/ml.

The morphology of the sperm cells was evaluated in a wet preparation and immersion phase contrast microscope with 1000x magnification. For this analysis, abnormalities of head, middle piece and tail were considered by counting 200 cells, classifying them into major and minor defects. An aliquot of the straws was placed in a glass vial, sealed and kept in a water bath, to perform the rapid thermoresistance test at a temperature of 46°C for 30 minutes (CBRA, 2013). At the end of the period, the sample was analyzed for the following variables: total motility and vigor by the subjective method under the light field microscope.

Sperm kinetics was determined by the computer assisted sperm analysis (CASA), Ivos-Ultimate model - Hamilton Thorne Biosciences, previously set up for bovine semen analysis. Two semen microliters were selected and at least seven fields

were selected for reading and analyzing the parameters: total motility (%; MT), progressive motility (%; MP), mean velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP), linear velocity ($\mu\text{m/s}$, VSL), curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL), lateral head amplitude (μm , ALC), linearity (%; LIN) and straightness (%; STR).

The structural integrity of the plasma membrane and mitochondrial polarization were evaluated by flow cytometry, using fluorescence probes PI (propidium iodide) and JC-1 (5,5',6,6'- tetrachloro - 1,1',3,3' - tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide) in the EasyCyte IMV France apparatus.

Statistical analysis

For the P/AI results, the binary (pregnant or no) response was considered and the multiple logistic regression analysis was performed, assuming a significance level of 5% and multiple correlation analysis between the variables (fertility of batches and results of laboratory tests). The design results were analyzed using the Proc Logistic software included in the Statistical Analysis System 9.1.3 (SAS Institute Inc., 2000).

Also, means of seminal parameters were analyzed using ANOVA (Proc GLIMMIX, SAS® 9.3, Inc., Cary, NC, USA) with $P < 0,05$ considered significant. The models included breed (Angus and Nelore). All values are reported as Least Square Means.

Results and discussion

Were computed the P/AI rate according breed and biome. As the results given in the Table 1, Nelore bulls produced higher P/AI rate in zebu cows ($P=0.037$) submitted to TAI. When evaluating the biome conditions, cows inseminated in Cerrado farms obtained higher P/AI ($P=0.003$) rate when compared to those kept in the Pantanal but there was no interaction between breed and biome.

Table 1. Pregnancy rates of zebu cows submitted to TAI, according to bull breed and farm location

Variables	Breed			Biome		
	Angus	Nelore	P	Pantanal	Cerrado	P
N	790	759	-	892	657	-
Pregnancy, %	47.59 (376)	53.88 (409)	0.037	45.85 (409)	56.16 (369)	0.003

Descriptive statistics were computed by breed for all seminal parameter's analysis (Table 2). These results showed seven different attributes who were responsible by higher P/AI rates in Nelore bulls, being them: total defects, major defects, VAP, LIN, STR, VCL and ALH.

Table 2. Post thawing seminal quality of bulls

	Angus	Nelore	P
PAI	47.59	53.09	0.03
BSC of cows (1-5)	3.25	3.23	0.4
Convencional analysis			
Total defects, %	18.52	17.19	0.04
Major defects, %	12.2	10.22	0.01
Motility, %	37.17	44.06	0.30
Motility post thermal resistance test (TRT), %	13.39	19.03	0.37
Total concentration, sperm $\times 10^6/\text{ml}$	63.25	46.60	0.07
Flow Cytometry			
Cells with positive potential mitochondrial, %	45.85	50.63	0.28
Sperm with intact membranes, %	43.63	49.08	0.35

Computer Analyze (CASA)			
Total Motility, %	34.39	38.37	0.06
Progressive Motility, %	27.28	28.10	0.16
Pathway Velocity (VAP), $\mu\text{m/s}$	87.45	99.78	0.01
Straightline Velocity (VSL), $\mu\text{m/s}$	76.45	82.50	0.21
Linearity (LIN), %	55.02	48.86	0.007
Straightness (STR), %	87.02	81.85	0.001
Amplitude Lateral of Head (ALH), μm	6.14	7.71	0.002
Curvilinear Velocity (VCL), $\mu\text{m/s}$	139.85	170.13	0.003

The morphological sperm abnormalities in the bull ejaculate is currently analysis in veterinary practice and common classified such as Blom (1972) based on importance to fertility in two sperm populations, denoted as major and minor defects. In this work, Angus bulls showed higher total and major defects than Nelore bulls, predisposing to lower P/AI rate. This propose agrees with the logistic regression analysis that showing a negative correlation of the total defects with the predictive value of pregnancy rate (Fig 2).

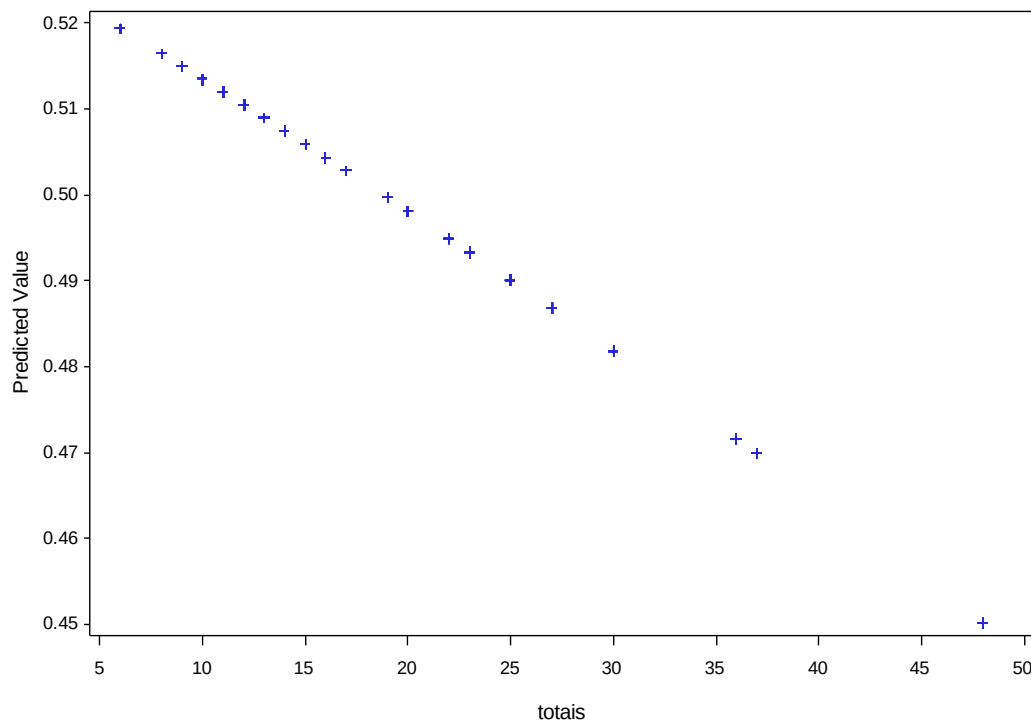


Fig 2. Distribution of the predict value of P/AI rate as a function of the total defects (totals) of bull semen post thawing (P=0.09; $R^2=0.04$).

In computer analysis, Nelore bulls showed higher velocity parameters (VAP and VCL) and ALH than Angus. Moreover, Nelore bulls had lower STR and LIN. These values may have interfered in p/ai rate of this breed and is according to others researches that suggesting that these parameters, together or isolated, are relevance to predict bull fertility (CSEH et al., 2003; NAGY et al.,2015).

The logistic regression analysis showed a concordance of 54.9%, with a probability of distinguishing pregnancy rate from variables: curvilinear velocity (VCL; $P = 0.003$), linearity (LIN; $P = 0.007$) and the pregnancy rate among bulls ranged from 22.9 to 59.4% ($P = 0.016$). The variable VCL presented an ascending distribution curve, with gestation rates above 50% predicted when velocities were higher than 140 $\mu\text{m/s}$ (Fig 3). In relation to LIN, a negative effect was observed, resulting in higher pregnancy (Fig 4).

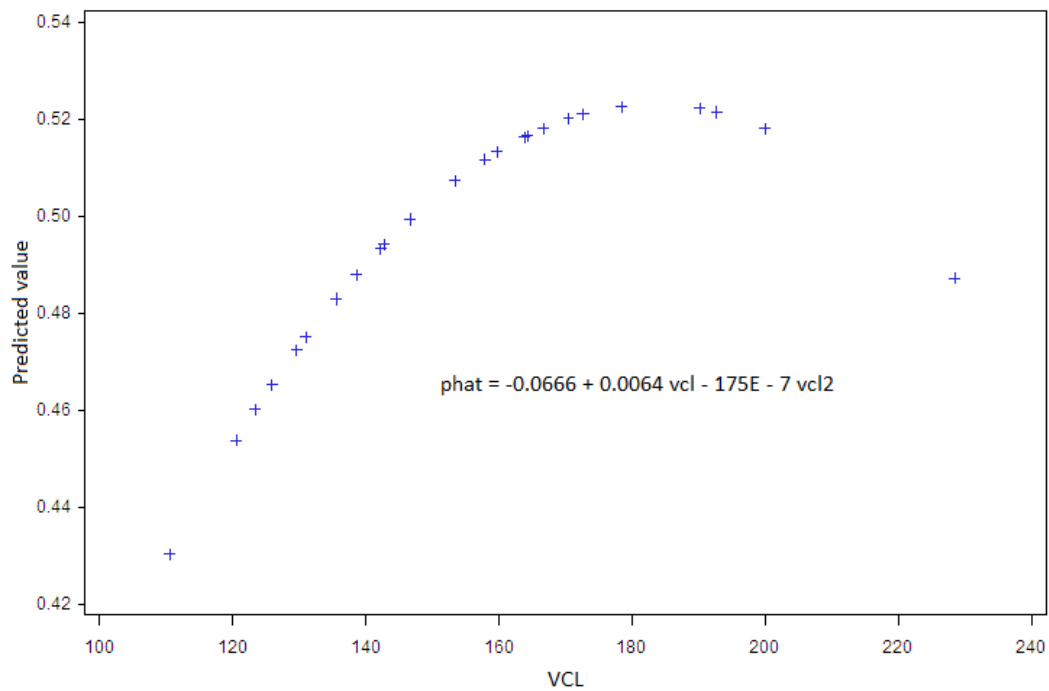


Fig 3. Distribution of the predict value of pregnancy rate as a function of the sperm curvilinear velocity (VCL-CASA) of bull semen post thawing ($P=0.003$; $R^2=0.107$).

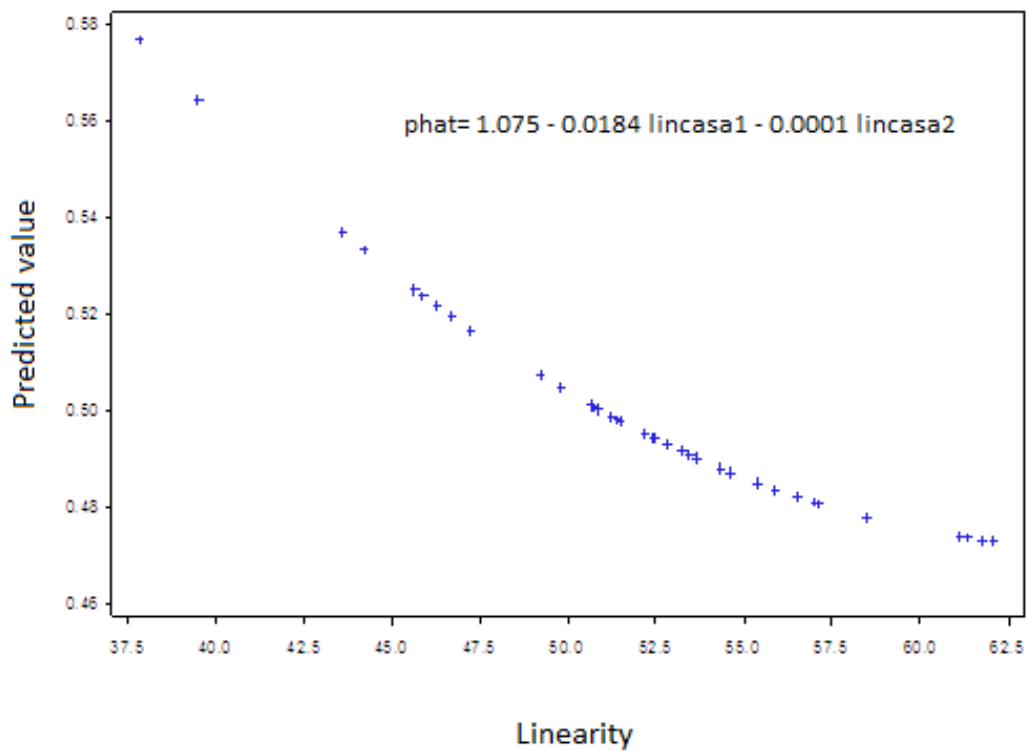


Fig 4. Distribution of the pregnancy rate as a function of the sperm linearity (CASA) of bull semen post thawing ($P=0.05$; $R^2=0.11$).

The other variables evaluated don't influence the probability of pregnancy in cows submitted to TAI, so new studies are underway to evaluate associations between laboratory parameters and fertility, aiming at improvements in fertility prediction based on post-thaw seminal evaluation.

Conclusions

Comparing the conditions proposed, the bull breed and the biome exert a considerable influence on P/AI rates and the evaluation of semen is important to identify samples with greater fertilizer potential.

References

- ABREU, U.G.P.; NOGUEIRA, É.; OLIVEIRA, L. O. F.; GOMES, R. C.; MENEZES, G. R. O.; BORGES, J.C.S. Sistemas Intensivos de Produção na Região Tropical Brasileira. **In:** II Simpósio Internacional sobre sistemas de produção de bovinos de corte. Porto Alegre: UFRGS, 2015. v. 10. p. 244-254, 2015.
- ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOSKINEN, E. DAHLBOM, M. 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.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the Bull spermogram. **In:** Symposium International di Zootechnie, 7, 1972, Milano. The Symposium, 1972. p.125-139.
- CBRA** - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3 ed. Belo Horizonte, CBRA, 2013.
- CSEH, S.; POLICHRONOPOULOS, T.; SOLTI, L. (2003). Prediction of bull fertility by computer assisted semen analysis. **Reproduction, Fertility and Development**. V.16, p. 128-129, 2003.
- NAGY, Á.; POLICHRONOPOULOS, T.; GÁSPÁRDY, A.; SOLTI, L.; CSEH, S. 2015. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. **Acta Vet Hung**, v. 63, p.370–381, 2015.
- NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNINSSON, A. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Anim Reprod Sci**, v.80, n.3-4, p.225-235, 2004.
- NOGUEIRA, É.; SILVA, A. S.; MARQUES JÚNIOR, H. R.; NOGUEIRA, R. J.; BORGES, J. C. Taxa de prenhez de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF

no Planalto Boliviano Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011b. 5p. (Embrapa Pantanal. **Circular Técnica**, 101).

NOGUEIRA, É; SILVA, A. S; DIAS, A. M.; ITAVO, L. C. V.; BATISTOTE, E. Taxa de prenhez de vacas Nelores submetidas a protocolos de IATF no Pantanal de MS. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011a. 6 p. (Embrapa Pantanal. **Circular Técnica**, 97).

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; BELETTI, M.E.; PERES, R.F.G.; OLIVEIRA, C.S.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. 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. **Livest sci**, v. 146, p. 38-46, 2001.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; CELEGUINI, E.C.C.; SANTOS, R.M.; BELETTI, M.E.; PERES, R.F.G.; MONTEIRO, F.M.; LIMA, V.F.H. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Anim Reprod Sci**, v.137, p.145–55, 2013.

OLIVEIRA, L. O. F. de; ABREU, U. G. P. de; DIAS, F. R. T., FERNANDES, F. A.; NOGUEIRA, E., SILVA, J. C. B. da. Estimativa da população de bovinos no Pantanal por meio de modelos temáticos e índices tradicionais. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2016. 11 p. (Embrapa Pantanal. Comunicado Técnico, 99). Disponível em: <www.cpap.embrapa.br/publicações/online/COT99.pdf> Acesso em: 3 nov. 2016.

POTT, E.B.; ALMEIDA, I.L; BRUM, P.A.R.; TULLIO, R.R.; SQUASA, J.C.; AROEIRA, J.A.D.C. Desempenho reprodutivo de bovinos na subregião dos Paiaaguás do Pantanal Mato-Grossense. III - Efeito da suplementação mineral sobre variáveis reprodutivas e ponderais de vacas de cria. **Pesq Agrop Bras**, v. 23, p. 87-96, 1988.

PUGLISI, R.; POZZI, A.; FOGGIO, L.; SPANO, M.; ELEUTERI, P.; GROLLINO, M. G.; BONGIONI, G.; GALLI, A. The usefulness of combining traditional sperm assessments with in vitro heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated in vivo. **Anim Reprod Sci**, v. 132, p.17–28, 2012.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. **Anim reprod Sci**, v. 10, p. 148-159, 2013.

SAS INSTITUTE. **User software**: changes and enhancements through release. Cary: SAS Institute, 2000.

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

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