



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANA BEATRIZ MARQUES DE ALMEIDA

**RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROAKAP4 E  
FERTILIDADE DO SÊMEN BOVINO *BOS INDICUS*  
EMPREGADO EM PROGRAMAS DE IATF**

---

Londrina  
2022

ANA BEATRIZ MARQUES DE ALMEIDA

**RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROAKAP4 E  
FERTILIDADE DO SÊMEN BOVINO *BOS INDICUS*  
EMPREGADO EM PROGRAMAS DE IATF**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Mello Martins

Londrina  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Almeida, Ana Beatriz Marques.

Relação da concentração de proAKAP4 e fertilidade do sêmen bovino *Bos indicus* empregado em programas de IATF / Ana Beatriz Marques Almeida. - Londrina, 2022.  
90 f. : il.

Orientador: Maria Isabel Mello Martins.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Biomarcador de fertilidade - Tese. 2. Espermatozoides - Tese. 3. Bovino - Tese. 4. AKAP4 - Tese. I. Mello Martins, Maria Isabel. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

ANA BEATRIZ MARQUES DE ALMEIDA

**RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROAKAP4 E  
FERTILIDADE DO SÊMEN BOVINO *BOS INDICUS*  
EMPREGADO EM PROGRAMAS DE IATF**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Mello  
Martins  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Guilherme Rizzoto  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

---

Prof. Dr. André Maciel Crespilho  
Universidade de Santo Amaro – UNISA

---

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros  
Universidade Estadual do Norte do Paraná –  
UENP

---

Prof. Dr. Fábio Morotti  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 17 de fevereiro de 2022.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Isabel Mello Martins, um exemplo de mulher e profissional que eu tanto admiro. Agradeço imensamente por ter me acolhido de braços abertos, proporcionado inúmeras oportunidades ao longo desses anos, por ter acreditado no meu potencial e por sempre defender seus “patinhos”. Obrigada por ser essa orientadora parceira, minha eterna gratidão.

À toda minha família, pois foi graças a eles que pude atingir meus objetivos. Obrigada por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem de todas as formas.

Ao Fábio Lucas Zito de Moraes, agradeço pela amizade desde o mestrado, obrigada pelo compartilhamento os dados de IATF, sem você este estudo não seria possível. Agradeço ao Gabriel Crepaldi por fornecer as doses de sêmen sexado, que tanto contribuíram ao estudo. Muito obrigada ao prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> João Carlos Pinheiro Ferreira, pela recepção na UNESP-FMVZ e por proporcionar a estrutura e conhecimentos necessários para realização do kit ELISA.

Agradeço à melhor equipe de todos os tempos LARAA-TAC, que para sempre estará no meu coração. O meu eterno agradecimento a minha “best” e parceira, Myrian Hidalgo, nossa rainha das subpopulações espermáticas, e à nossa “diva” Jamile Haddad, que tanto me ajudaram e ensinaram nesses anos, nossa amizade e companheirismo são inesquecíveis. Ao Luiz Trautwein, nossa celebridade do LARAA, que tanto admiro, e que muito me auxiliou na estatística e citometria de fluxo. À Letícia e a Josi, que além de participarem do experimento se tornaram amigas, e sempre agregaram tanto em nossos conhecimentos sobre animais de companhia. E finalmente, aos residentes da TAC, sempre à nossa disposição para nos ajudar e nos ensinar.

Ao prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Fábio Morotti, pela parceria com a equipe LARAA, que sempre rende bons resultados, e pela participação na comissão avaliadora de qualificação e defesa. Agradeço imensamente ao prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> André Maciel Crespilho por agregar tanto conhecimento, e por novamente ter aceito o convite como banca examinadora de defesa. Ao prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Thales Ricardo Rigo Barreiros, que foi meu professor no curso de Medicina Veterinária, agradeço pelos ensinamentos que permeiam desde a graduação, pela parceria que se segue, e por participar de minha

banca avaliadora de defesa. O meu muito obrigada ao Dr<sup>o</sup>. Guilherme Rizzoto por ter aceito o convite como comissão avaliadora de defesa de forma tão acessível.

Agradeço ao programa de pós-graduação em Ciência Animal e à Universidade Estadual de Londrina, e a todos os funcionários, que proporcionaram os recursos essenciais para a realização dos experimentos, e tanto colaboraram com a minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado acadêmico.

ALMEIDA, Ana Beatriz Marques. **Relação da concentração de proAKAP4 e fertilidade do sêmen bovino *Bos indicus* empregado em programas de IATF.** 2022. 95 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## RESUMO

O sucesso da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) se deve, em parte, a touros férteis que produzem doses de sêmen de qualidade. A avaliação seminal pré e pós descongelamento, podem ser conduzidas por meio da cinética espermática, morfologia e morfo funcionalidade. Entretanto, estudos têm demonstrado que somente estas análises *in vitro* não são suficientes para prever a fertilidade de um ejaculado. Neste contexto, nos últimos anos, experimentos têm buscado por biomarcadores proteicos que apresentem relação com a fertilidade. A AKAP4 e sua precursora, proAKAP4, ganharam destaque, por serem polipeptídeos presentes no flagelo espermático, que demonstraram, relação com a motilidade dos espermatozoides e com taxas de fertilidade a campo. Diante do exposto, objetivou-se quantificar as concentrações de proAKAP4 em doses convencionais (n:8) e sexadas (n:6) de espermatozoides criopreservados de reprodutores *Bos indicus*; além de relacionar a proAKAP4 em doses de sêmen de touros Nelore (n:9) a taxas de prenhez obtidas por meio de programa de IATF. Além disso, 1507 vacas foram inseminadas artificialmente em tempo fixo com doses de 9 partidas de sêmen convencional avaliadas. As doses foram descongeladas à 37°C por 30 segundos, em seguida foi conduzida a análise da cinética espermática, morfologia e morfo funcionalidade. As concentrações de proAKAP4 foram mensuradas por meio de kit ELISA seguindo as recomendações do fabricante. O teste T foi utilizado para comparar variáveis entre dois grupos (sêmen sexado para fêmea vs. sêmen convencional), a correlação de Pearson avaliou as relações entre a proAKAP4 e as características cinéticas e morfofuncionais, e para mensurar a influência da proAKAP4 sobre parâmetros *in vitro* foi conduzida uma regressão linear. Considerou-se significância estatística quando  $p < 0,05$ . As doses de sêmen sexadas carreadoras do cromossomo X apresentaram maior concentração de proAKAP4 ( $67,54 \pm 17,40$  ng/ $10^6$  de espermatozoides) quando comparadas às doses convencionais ( $29,76 \pm 4,16$  ng/ $10^6$  de espermatozoides) ( $p = 0,033$ ). Contudo, não foram encontradas relações entre a quantidade de proAKAP4 e as variáveis cinéticas e morfofuncionais nos espermatozoides sexados ( $p > 0,05$ ). Nas doses seminais convencionais a proAKAP4 influenciou a motilidade espermática (TM:  $r^2 = 0.49$ ,  $P = 0.03$ ); PM:  $r^2 = 0.63$ ,  $P = 0.01$ ) e as taxas de concepção obtidas na IATF ( $r^2 = 0.51$ ,  $P = 0.03$ ). Finalmente, concluiu-se que a proAKAP4 não é um biomarcador fidedigno para sêmen sexado para fêmea, contudo é um excelente indicador de fertilidade em doses de sêmen convencional, e assim, acredita-se que futuramente poderá ser uma ferramenta na seleção de touros *Bos indicus* férteis.

**Palavras-chave:** AKAP4; biomarcador; espermatozoides; fertilidade; IATF.

ALMEIDA, Ana Beatriz Marques. **Relação da concentração de proAKAP4 e fertilidade do sêmen bovino *Bos indicus* empregado em programas de IATF.** 2022. 95 p. Thesis (Doctorate degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

The success of Fixed Time Artificial Insemination (FTAI) is related to fertile bulls which produces sperm presenting high quality. The sperm evaluation before and post thawing is conducted through sperm kinetics, morphology and morphofunctionality. However, studies have shown that these *in vitro* analyzes may not be sufficient to predict the fertility of an ejaculate. In recent years, experiments have searched for protein biomarkers that are related to fertility. AKAP4 and its precursor, proAKAP4, are being recognized, since these polypeptides are present in the sperm flagellum, and demonstrated relationship to sperm motility and fertility rates. The study aimed to quantify the concentrations of proAKAP4 in conventional (n:8) and X-sorted (n:6) doses of cryopreserved sperm from *Bos indicus* breeders; in addition to relating the proAKAP4 from sperm straws of Nelore bulls (n:9) to pregnancy rates obtained by a FTAI program. Besides, 1507 cows were artificially inseminated at a fixed time with doses of 9 batches of conventional semen evaluated. The doses were thawed at 37°C for 30 seconds, then the analysis of sperm kinetics, morphology and morphofunctionality was conducted. ProAKAP4 concentrations were measured using an ELISA kit following the manufacturer's recommendations. The T test was used to compare variables between two groups (X-sorted sperm vs. conventional sperm), the Pearson's correlation evaluated the relationships between proAKAP4 and kinetic and morphofunctional characteristics, and to measure the influence of proAKAP4 on *in vitro* parameters a linear regression was carried out, considering statistical significance when  $P < 0.05$ . The X-sorted sperm had a higher concentration of proAKAP4 ( $67.54 \pm 17.40$  ng/ $10^6$ spermatozoa) when compared to conventional doses ( $29.76 \pm 4.16$  ng/ $10^6$ spermatozoa) ( $P = 0.033$ ). However, no relationships were found between the proAKAP4 and the kinetics or morphofunctional variables in X-sorted sperm ( $P > 0.05$ ). At conventional sperm straws, proAKAP4 influenced sperm motility (TM:  $r^2 = 0.49$ ,  $P = 0.03$ ); PM:  $r^2 = 0.63$ ,  $P = 0.01$ ) and the conception rates obtained in the FTAI ( $r^2 = 0.51$ ,  $P = 0.03$ ). Finally, it was concluded that proAKAP4 is not a reliable biomarker for X-sorted sperm, however it is an excellent indicator of fertility in conventional sperm samples, and thus, it is believed that in the future it may be a helpful tool to selecting *Bos indicus* bulls.

**Key-words:** AKAP4; biomarker; spermatozoa; fertility; TAI.

## LISTA DE FIGURAS

### Referencial Teórico

- Figura 1** – Representação gráfica da trajetória de um espermatozoide avaliado pelo sistema CASA, contendo os parâmetros da cinética espermática fornecidos pelo sistema CASA: .....31
- Figura 2** – Representação gráfica da AKAP4 e sua função ancoradora da PKA. ....39

### Artigo 2

- Figura 2** – Graphical representation of the TAI protocol and pregnancy diagnosis performed in all the 1507 Nelore cows .....89

## LISTA DE GRÁFICOS

### Artigo 1

**Gráfico 1** – Correlation between proAKAP4 concentration and total motility, progressive motility, percentage of fast sperm, sperm membrane integrity and percentage of static sperm, in conventional sperm .....70

### Artigo 2

**Gráfico 2** – Graphical representation of the regression coefficient and equation between the proAKAP4 concentrations and total motility, progressive motility, fast sperm, slow sperm and pregnancy rate .....92

## LISTA DE TABELAS

### Referencial Teórico

<b>Tabela 1</b> – Principais proteínas espermáticas com potencial de biomarcador de qualidade e/ou fertilidade do sêmen bovino. ....	36
--	----

### Artigo 1

<b>Tabela 1</b> – Mean ( $\pm$ SEM) values of CASA system kinetics parameters of bovine X-sorted vs. conventional sperm.....	68
<b>Tabela 2</b> – Mean ( $\pm$ SEM) values of mitochondrial activity and plasmatic membrane integrity of bovine X-sorted vs. conventional sperm .....	68
<b>Tabela 3</b> – Mean ( $\pm$ SEM) of proAKAP4 concentrations of in bovine X-sorted sperm vs. conventional sperm.....	69

### Artigo 2

<b>Tabela 4</b> – Kinetics, morphology and morpho-functionality results from the nine frozen thawed Nellore sperm samples .....	90
<b>Tabela 4</b> – The proAKAP4 concentrations and its respective conception rate from each bull evaluated .....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKAP3	Proteína Ancoradora da Quinase-3
AKAP4	Proteína Ancoradora da Quinase-4
ALH	Amplitude do deslocamento lateral de cabeça
BCF	Frequência do batimento flagelar cruzado
BE	Benzoato de Estradiol
BVD	Diarreia viral bovina
CASA	Análise computadorizada de sêmen
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CE	Cipionato de estradiol
CEUA	Comitê de ética de uso de animais
DANCE	Relação VCL X ALH
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IBR	Rinotraqueíte infecciosa bovina
IGF1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
LH	Hormônio luteinizante
LIN	Linearidade
MITO	Atividade Mitocondrial
P4	Progesterona
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
PI	Iodeto de propídeo
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embrião
PKA	Proteína Quinase A
ProAKAP4	Precursora da Proteína Ancoradora da Quinase-4
ROS	Espécies reativas de oxigênio
STR	Linearidade
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VAP	Velocidade média do trajeto

VCL	Velocidade Curvilínea
VSL	Velocidade progressiva
WOB	Taxa de oscilação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
2.1	A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO.....	16
2.1.1	Cenário da IATF no Brasil .....	16
2.1.2	Inseminação Artificial em Tempo Fixo em Fêmeas de Corte: Definição e Protocolos.....	16
2.1.3	Fatores que Influenciam os Resultados da IATF .....	18
2.2	CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO.....	20
2.2.1	Crioinjúrias dos Espermatozoides Bovinos.....	20
2.2.2	Diluentes para Criopreservação do Sêmen Bovino .....	21
2.2.3	Taxas de Congelação para o Sêmen Bovino .....	23
2.2.4	Comercialização de Sêmen Bovino Criopreservado no Brasil.....	25
2.3	SEXAGEM DO SÊMEN BOVINO .....	26
2.3.1	Principais Métodos de Sexagem de Espermatozoides Bovinos .....	26
2.3.2	Uso do Sêmen Sexado em Biotécnicas Reprodutivas .....	28
2.4	AVALIAÇÃO DO SÊMEN BOVINO .....	29
2.4.1	Avaliação da Cinética Espermática e o Sistema CASA.....	30
2.4.2	Avaliação da Morfologia Espermática .....	32
2.4.3	Avaliação Morfofuncional dos Espermatozoides Bovinos por meio da Citometria de Fluxo .....	33
2.4.4	Análise de Proteínas Espermáticas .....	34
2.5	A PROAKAP4 COMO BIOMARCADOR DE QUALIDADE E FERTILIDADE PARA O SÊMEN BOVINO.....	38
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>63</b>
5.1	OBJETIVO GERAL .....	63
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63

6	<b>ARTIGO 1</b> – The proAKAP4 use as a biomarker for the <i>Bos indicus</i> bulls X-sorted sperm quality .....	64
6	<b>ARTIGO 2</b> – The proAKAP4 concentrations in <i>Bos indicus</i> bull sperm and its relation to TAI pregnancy rate results .....	75
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	93

## 1 1 INTRODUÇÃO

2 A implementação da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF),  
3 permite a multiplicação do rebanho com alto ganho genético, ao mesmo passo que  
4 gera eficiência reprodutiva para um plantel (BARUSELLI et al., 2018; MARQUES et  
5 al., 2018). Desta forma, nos últimos anos, essa tecnologia têm sido amplamente  
6 utilizada no Brasil, sendo que no ano de 2020 foram comercializados mais de 21  
7 milhões de protocolos hormonais para a IATF e 23 milhões de doses de sêmen bovino  
8 criopreservadas (BARUSELLI, 2021).

9 Outro fator que chama a atenção na cadeia produtiva dos bovinos é o  
10 emprego do sêmen sexado, que possibilita a escolha do sexo do concepto (SCOTT et  
11 al., 2018). A sexagem espermática da espécie bovina vêm sofrendo reformulações  
12 em sua metodologia nos últimos anos, tais como maior estabilidade nas variações do  
13 pH, realização da técnica em temperatura ambiente adequada e adição de  
14 antioxidantes aos extensores de sêmen, tudo isso com intuito de melhorar a qualidade  
15 deste tipo de sêmen e assim aumentar as taxas de prenhez na IATF (GONZÁLEZ  
16 MARÍN, 2020; MARQUES et al., 2018; SCOTT et al., 2018; THOMAS et al., 2019).

17 Devido ao touro e a qualidade seminal demonstrarem efeito sobre o  
18 sucesso da IATF (DELLAQUA et al., 2009), salienta-se que a seleção de reprodutores  
19 é de extrema importância, e deve ser embasada no potencial de fertilidade e na  
20 qualidade do sêmen deste animal (FRASER, 2017). A taxa de prenhez é considerada  
21 o melhor parâmetro para avaliar a fertilidade de um touro, no entanto, a avaliação  
22 deste fator pode levar longos períodos de tempo (AMANN; DEJARNETTE, 2012;  
23 HOLDEN et al., 2017). Assim, para garantir a qualidade seminal, e de certa forma,  
24 prever a fertilidade dos espermatozoides com maior agilidade, inúmeros testes *in*  
25 *vitro* podem ser executados (BERGSTEIN; WEISS; BICUDO, 2014).

26 As avaliações seminais mais utilizadas são: cinética espermática, que  
27 pode ser feita de maneira subjetiva, ou objetiva com auxílio do sistema CASA (análise  
28 computadorizada de sêmen); morfologia espermática, a qual avalia a estrutura dos  
29 espermatozoides; e a morfofuncionalidade, que pode ser realizada por meio da  
30 citometria de fluxo, a qual é capaz de analisar uma gama de parâmetros espermáticos,  
31 como função mitocondrial e integridade de membrana (BERGSTEIN; WEISS;  
32 BICUDO, 2014; GLIOZZI et al., 2017; KATHIRAVAN et al., 2011; SAACKE, 2008).  
33 Embora estas análises, sejam essenciais para a comprovação da qualidade

1 espermática, nem sempre se relacionam à fertilidade a campo (KAYA; MEMILI, 2016;  
2 SOMASHEKAR et al., 2017).

3 Em decorrência das questões abordadas, experimentos vêm buscando  
4 biomarcadores espermáticos que se relacionem diretamente com as taxas de  
5 fertilidade (KAYA; MEMILI, 2016; SERGEANT et al., 2019). Sendo assim, o estudo de  
6 proteínas que compõe o espermatozoide em si, bem como proteínas presentes no  
7 plasma seminal, podem vir a elucidar a fisiologia espermática, e se tornar marcadores  
8 da fertilidade de ejaculados de touros (CODINA et al., 2015).

9 A proteína AKAP4 (proteína ancoradora da quinase-4) e a proAKAP4  
10 (precursora da AKAP4) vêm ganhando destaque como potenciais biomarcadores  
11 proteico (BLOMMAERT et al., 2018; DELEHEDDE et al., 2019). Esta proteína é parte  
12 estrutural do flagelo espermático e possui funções importantes relacionadas à  
13 motilidade espermática (SERGEANT et al., 2019; TURNER et al., 1999).

14 A proAKAP4 surge na fase de espermátide durante a  
15 espermatogênese e atua como um estoque de AKAP4 (BROWN et al., 2004;  
16 DELEHEDDE et al., 2019; SERGEANT et al., 2019; TURNER et al., 1999). O  
17 polipeptídeo já foi avaliado em espermatozoides humanos (JUMEAU et al., 2018),  
18 ovinos (RIESCO et al., 2020), equinos (BLOMMAERT et al., 2018), de dromedários  
19 (MALO et al., 2021) e bovinos de raças taurinas (BASTAN; AKCAY, 2021). Estudos  
20 anteriores já descrevem a relação da proAKAP4 com a cinética dos espermatozoides  
21 de machos *Bos taurus* e com taxas de fertilidade a campo (BASTAN; AKCAY, 2021;  
22 RUELLE, I. et al., 2020). Em contraponto, vale salientar que há uma lacuna na  
23 literatura acerca da avaliação da proAKAP4 em espermatozoides *Bos indicus*, seja  
24 convencional ou sexado, e a relação deste biomarcador com taxas de prenhez na  
25 IATF.

26 A presente revisão visa abordar o cenário da IATF no Brasil, a  
27 congelamento, sexagem e a aplicabilidade do sêmen bovino em biotecnologias  
28 reprodutivas. Além disso, o referencial teórico também irá elucidar as principais  
29 técnicas de avaliação seminal *in vitro*, a busca por marcadores de fertilidade de origem  
30 proteica, e finalmente a relevância da AKAP4 e proAKAP4 como biomarcadores  
31 fidedignos de fertilidade no sêmen bovino.

## 1 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2 2.1 A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

3 As biotécnicas da reprodução animal são estratégias capazes de  
4 agregar eficiência reprodutiva e melhoramento genético a um plantel, sendo a IATF  
5 uma tecnologia de destaque neste cenário. A IATF possui a vantagem de suprimir a  
6 visualização de estro, fator que gerava falhas na Inseminação Artificial convencional  
7 (IA) (BÓ et al., 2018).

#### 8 2.1.1 Cenário da IATF no Brasil

9 Devido ao Brasil ser um dos maiores produtores de proteína bovina  
10 no cenário mundial, o uso de biotecnologias reprodutivas se tornou essencial para a  
11 manutenção do país nesta posição de destaque. Sendo assim, a IATF é uma das  
12 biotécnicas em ascensão nos últimos 20 anos no Brasil (SARTORI et al., 2016).

13 O crescimento econômico da bovinocultura de corte, se dá pelo maior  
14 número de bezerros nascidos por temporada (BARUSELLI et al., 2018). Neste  
15 contexto, a IATF surge como uma ferramenta para agregar melhoramento genético  
16 ao mesmo passo em que maximiza a produção de bovinos (BARUSELLI et al., 2018;  
17 FARIAS et al., 2020).

18 Somente no ano de 2020, a inseminação artificial cresceu 30% no  
19 Brasil, sendo que dentre estes 30%, 90% foram executadas em tempo fixo. Ainda em  
20 2020 mais de 21 milhões de protocolos de IATF foram comercializados e empregados  
21 em cerca de 20 milhões de fêmeas bovinas (BARUSELLI, 2021).

#### 22 2.1.2 Inseminação Artificial em Tempo Fixo em Fêmeas de Corte: Definição e 23 Protocolos

24 A IATF envolve o uso de protocolos hormonais que induzem o estro e  
25 a ovulação simultânea de várias fêmeas bovinas em diferentes fases do ciclo estral, e  
26 em seguida é realizada a IA de todas estas fêmeas. Os principais protocolos utilizados  
27 na América Latina, contém estradiol ou GnRH (Hormônio liberador de gonadotropinas)

1 como base (BÓ et al., 2018).

2 O Ovsynch originalmente se baseia no emprego do GnRH. Sendo que  
3 é feita uma aplicação deste hormônio para iniciar o tratamento e induzir a liberação  
4 de LH (hormônio luteinizante) com intuito de promover a ovulação e iniciar uma nova  
5 onda folicular. Passados 6 ou 7 dias da aplicação de GnRH, é ministrada uma dose  
6 de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), que promove uma luteólise da possível primeira  
7 ovulação. Após 48 horas (D9) é feita uma segunda aplicação de GnRH e no mesmo  
8 momento as vacas são inseminadas (BÓ; BARUSELLI, 2014; GEARY *et al.*, 2001).  
9 Embora este protocolo seja mais aplicado em fêmeas de leite, nota-se que a adição  
10 do dispositivo de P4 pode promover um aumento significativo nas taxas de prenhez  
11 quando esta metodologia é empregada em novilhas com aptidão de corte  
12 (GOTTSCHALL; ROCHA, 2018).

13 Os protocolos que se baseiam em estradiol associados à P4, são mais  
14 utilizados em gado de corte na América Latina (BÓ et al., 2018). Embora os protocolos  
15 possam sofrer algumas alterações nos dias de administração dos fármacos; em suma  
16 o procedimento se inicia com a inserção de um dispositivo intravaginal de  
17 progesterona (P4) e administração de benzoato de estradiol (D0), ocasionando atresia  
18 dos folículos ovarianos e iniciando uma nova onda folicular. Depois de 7 dias (D7), o  
19 dispositivo de P4 é retirado, é feita a aplicação de cipionato de estradiol (CE), e a  
20 PGF2 $\alpha$  é administrada, desta forma a luteólise é confirmada e promove-se a ovulação;  
21 a inseminação é feita após 48 horas (D9) (BÓ et al., 2018; BÓ; BARUSELLI;  
22 MANPLETOFT, 2013).

23 Um estudo já demonstrou que uma variação de 10 horas para a  
24 retirada do dispositivo de P4 e aplicação do BE não afeta a eficiência reprodutiva das  
25 fêmeas sincronizadas por protocolos hormonais (CREPALDI et al., 2019). Além disso,  
26 o uso de 250mg de progesterona injetável realizada em D0 do protocolo para IATF foi  
27 testado como alternativa ao dispositivo intravaginal, entretanto, as taxas de prenhez  
28 ainda foram superiores nas vacas em que se utilizou o dispositivo de P4 (MOROTTI  
29 et al., 2018).

30 A aplicação da gonodotrofina coriônica equina (eCG) também está  
31 sendo empregada em protocolos de IATF, com a finalidade de promover o  
32 crescimento folicular, principalmente em fêmeas bovinas com frequência reduzida dos  
33 pulsos de LH (BOTTINO et al., 2021; SALES et al., 2016). Nestes casos, a aplicação  
34 do eCG é realizada após a retirada do implante de progesterona (BOTTINO et al.,

1 2021; SALES et al., 2016). Vale ressaltar que a implementação do eCG em protocolos  
2 de IATF promovem maior crescimento folicular, taxa de ovulação, fertilidade e  
3 tendência à maior taxa de prenhez em fêmeas *Bos indicus* (SALES et al., 2016;  
4 SMALL et al., 2009).

### 5 2.1.3 Fatores que Influenciam os Resultados da IATF

6 Os índices da IATF sofrem influências extrínsecas ao protocolo como  
7 manejo das fêmeas bovinas, estresse térmico, problemas nutricionais, moléstias  
8 infecciosas da esfera reprodutiva e baixa qualidade do sêmen utilizado (FERNANDEZ-  
9 NOVO et al., 2020).

10 O estresse térmico pode afetar negativamente as taxas de prenhez  
11 mesmo em fêmeas zebuínas submetidas à IATF (KAJAYSRI; WATTANANORASATE,  
12 2018). Isto se dá, pois o estresse calórico induz à crescente produção e liberação de  
13 cortisol, que por sua vez induz o declínio de estrógeno e conseqüente redução na  
14 expressão do estro (BRIGGS; ROOD, 2003). Em animais zebuínos acredita-se que o  
15 estresse térmico instalado nas fêmeas inseminadas em tempo fixo possa reduzir a  
16 viabilidade e capacitação espermática dentro do sistema reprodutor das fêmeas, além  
17 de que a hipertermia em vacas inseminadas induz a perda embrionária (HANSEN et  
18 al., 2001; KAJAYSRI; WATTANANORASATE, 2018; LÓPEZ-GATIUS, 2012).

19 Em se tratando de machos reprodutores, até mesmo os animais de  
20 raças índicas são passíveis de sofrer os malefícios do estresse térmico, os quais se  
21 refletem no aumento da temperatura testicular, levando a redução da concentração  
22 espermática, danos na motilidade, morfologia e capacidade fertilizante dos  
23 espermatozoides (MORRELL, 2020; RIZZOTO et al., 2020; ROMANELLO et al., 2018;  
24 SHAHAT; RIZZOTO; KASTELIC, 2020). Um estudo recente, realizado em touros  
25 Nelore em idade reprodutiva apontou que as altas temperaturas testiculares reduziram  
26 significativamente a produção de testosterona, aumentaram a expressão de  
27 compostos antioxidantes, além de lesar células presentes nos testículos que são  
28 essenciais para a espermatogênese (RIZZOTO et al., 2020).

29 Ainda levando o clima em consideração, este tem grande influência  
30 sobre a produção de pastagem, e em conseqüência na disponibilidade de alimentos  
31 para os bovinos. Sendo assim, a escassez alimentar e a restrição nutricional

1 impactam negativamente no desenvolvimento inicial do embrião, podendo ocorrer  
2 maiores perdas embrionárias (NEGREIROS et al., 2020; REESE et al., 2020a).

3 A nutrição das fêmeas inseminadas é outro fator capaz de garantir o  
4 sucesso da IATF. O escore de condição corporal (ECC) reflete a condição nutricional  
5 das vacas (AYRES et al., 2009), por isso, estudos demonstraram a relação entre o  
6 ECC e a taxa de prenhez em vacas *Bos indicus* inseminadas em tempo fixo, sendo  
7 que a taxa de gestação tende a aumentar em fêmeas com escore acima de 2,75  
8 (escala de 1 a 5) (MORAES et al., 2019; PEREIRA et al., 2018; PFEIFER;  
9 RODRIGUES; NOGUEIRA, 2021). Nota-se que fêmeas com ECC acima de 2,75 têm  
10 mais reservas enérgicas, as quais serão aplicadas no metabolismo hormonal. Isto se  
11 deve ao fato de que a nutrição promove uma homeostase metabólica, a qual controla  
12 a secreção de hormônios reprodutivos, como leptina, IGF1 (fator de crescimento  
13 semelhante à insulina 1) e Ghrelina. Além disso, fatores nutricionais têm ação sobre  
14 o crescimento folicular e desenvolvimento embrionário (BO; BARUSELLI, 2004;  
15 D'OCCHIO; BARUSELLI; CAMPANILE, 2019; PEREIRA et al., 2018).

16 Uma questão também relevante para obtenção de resultados  
17 satisfatórios é em relação à categoria animal. A literatura descreve que novilhas e  
18 primíparas apresentam taxas de gestação mais baixas em relação às vacas, isto  
19 provavelmente acontece em decorrência da redução da frequência de pulsos de LH e  
20 redução do crescimento folicular (BOTTINO et al., 2021; COLAZO; MAPLETOFT,  
21 2014; FARIAS et al., 2020; LUCY; MCDUGALL; NATION, 2004). Já em fêmeas  
22 recém paridas e lactantes, também observa-se a redução dos pulsos de LH, o que  
23 poderia reduzir as chances reprodutivas desses animais, contudo, protocolos de IATF  
24 contendo eCG podem melhorar o desenvolvimento folicular e com isso aumentar as  
25 taxas de prenhez nesta categoria animal (SÁ FILHO, M. F. et al., 2010; SÁ FILHO,  
26 Manoel F. et al., 2013).

27 No Brasil, a leptospirose, a diarreia viral bovina (BVD) assim como a  
28 rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) são consideradas moléstias endêmicas e que  
29 afetam a reprodução dos bovinos (SARTORI et al., 2020). Desta forma, o calendário  
30 sanitário adequado, com a vacinação para tais doenças tende a reduzir perdas  
31 embrionárias e abortos, otimizando os resultados obtidos por programas de IATF  
32 (ALFIERI et al., 2019; DE SOUZA SARTORI et al., 2020).

33 Taxas de prenhez dependem do desenvolvimento adequado dos  
34 embriões e da placentação, e para isto, tanto o oócito quanto o espermatozoide têm

1 funções essenciais. Sendo assim, são necessárias doses de sêmen com qualidade  
2 garantida (SEVERO, 2009), pois quando utilizados espermatozoides de baixa  
3 qualidade, estes podem afetar negativamente os resultados da IATF (FARIAS et al.,  
4 2020; SEVERO, 2009). O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal preconiza que  
5 doses de sêmen bovino criopreservadas para uso em biotécnicas reprodutivas, como  
6 IATF, devem ter no mínimo 30% de espermatozoides móveis e pelo menos 70% de  
7 células espermáticas sem defeitos morfológicos (CBRA, 2013).

## 8 2.2 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO

9 A aplicação do sêmen bovino criopreservado permitiu o  
10 estabelecimento de biotecnologias como a IA ou a IATF (UGUR et al., 2019). Estas  
11 ferramentas foram significativamente capazes de maximizar a produção mundial de  
12 alimentos ao possibilitar a conservação e propagação de material genético melhorador  
13 (GRÖTTER et al., 2019; PERIS-FRAU et al., 2020; UGUR et al., 2019).

14 Os primeiros dados acerca da congelação do sêmen remetem à  
15 Spallanzani no século XVIII, que preservou sêmen no gelo (HEZAVEHEI et al., 2018;  
16 ROYERE et al., 1996). A partir daí as técnicas para criopreservação do sêmen  
17 avançaram consideravelmente, se estabelecendo de fato na década de 1970  
18 (GRÖTTER et al., 2019).

19 A principal função da congelação espermática é a manutenção da  
20 viabilidade celular após a exposição a baixas temperaturas (GRÖTTER et al., 2019;  
21 WOODS et al., 2011). Entretanto, é observado um decréscimo na qualidade e  
22 fertilidade no sêmen de ruminantes após a descongelação (PERIS-FRAU et al., 2020;  
23 SHANGGUAN et al., 2020).

24

### 25 2.2.1 Crioinjúrias dos Espermatozoides Bovinos

26 Em decorrência do espermatozoide ser uma célula com menor  
27 conteúdo aquoso intracelular e membranas fluídas, acreditava-se que seriam mais  
28 resistentes à criopreservação e descongelação. Contudo, a célula espermática é  
29 passível de sofrer inúmeros danos sob baixas temperaturas, resultando em  
30 encolhimento da célula, desnaturação das proteínas que a compõe, além de falhas

1 irreversíveis na membrana plasmática (KHALIL et al., 2018; UGUR et al., 2019).

2 A princípio a membrana plasmática dos espermatozoides é  
3 influenciada pela quantidade de fosfolípidios que a compõe (GRÖTTER et al., 2019).  
4 Isto ocorre, pois conforme a temperatura decresce, a membrana vai perdendo sua  
5 fluidez original passando do estado líquido para gelatinoso. Com isso, as cadeias de  
6 ácidos graxos se rearranjam, dando origem à uma estrutura rígida, porém frágil  
7 (GRÖTTER et al., 2019; LEMMA, 2011; UGUR et al., 2019).

8 O estresse osmótico sofrido pelos espermatozoides durante a  
9 criopreservação, é outro ponto que reduz a viabilidade espermática pós  
10 descongelação. A diluição do sêmen bovino em extensores para a criopreservação  
11 submete os espermatozoides a um meio hipertônico, induzindo a saída de líquido  
12 intracelular para o meio extracelular, que causa uma desidratação nas células. Os  
13 danos espermáticos ocorrem quando a desidratação excede a resistência celular,  
14 gerando injúrias irreversíveis à membrana espermática (GRÖTTER et al., 2019).

15 Outro fator que contribui para os danos aos espermatozoides  
16 bovinos, é a formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS), como peróxido de  
17 hidrogênio e ânion superóxido. Sabe-se que em quantidades adequadas, as ROS  
18 possuem funções fisiológicas essenciais para capacitação espermática. A toxicidade  
19 destes compostos ocorre quando durante a criopreservação, a membrana das  
20 mitocôndrias ao sofrer injúrias em sua fluidez aumenta a concentração de ROS  
21 produzida. Estes radicais livres em excesso promovem danos ao DNA espermático e  
22 levam à peroxidação lipídica da membrana plasmática (GRÖTTER et al., 2019;  
23 MOUSAVI et al., 2019; UGUR et al., 2019).

#### 24 2.2.2 Diluentes para Criopreservação do Sêmen Bovino

25 A diluição em extensores específicos para a congelação de  
26 espermatozoides bovinos é essencial para a preservação do material genético, bem  
27 como para a proteção das células às crioinjúrias e, portanto, devem ser capazes de  
28 manter as características do sêmen prévias à congelação. Os diluentes devem possuir  
29 como componentes mínimos: uma substância isotônica e tampão que mantenha a  
30 osmolaridade e o pH da célula; crioprotetor, para prevenir o choque térmico; uma fonte  
31 de energia; e finalmente antibióticos para controle de microorganismos (RAHEJA et  
32 al., 2018).

1 Os crioprotetores previnem a formação de cristais de gelo, além de  
2 auxiliar na mitigação do estresse osmótico e químico. São classificados de acordo  
3 com sua permeabilidade nas células, considerados permeáveis ou não permeáveis,  
4 sendo que na maioria dos diluentes, ambos os tipos de crioprotetores estão presentes  
5 (KOWALCZYK; KUCZAJ; CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, 2020). Os principais  
6 crioprotetores não permeáveis utilizados na congelação de sêmen bovino incluem a  
7 gema de ovo, leite, água de coco e lecitina de soja; já o glicerol é o crioprotetor  
8 permeável que apresenta melhores resultados para a congelação de espermatozoides  
9 bovino (KOWALCZYK; KUCZAJ; CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, 2020; MOUSAVI et  
10 al., 2019; RAHEJA et al., 2018).

11 As substâncias tampão têm a função de manter o pH entre 6,8 a 7,1  
12 e a pressão osmótica próxima de 300mMol, valores fisiológicos do sêmen. O tampão  
13 mais utilizado é o citrato, como citrato trissódico dihidratado, que tem capacidade de  
14 neutralizar os íons hidrogênio produzidos pelo metabolismo celular dos  
15 espermatozoides (HAFEZ; HAFEZ, 2016; LEITE et al., 2011).

16 A manutenção energética se dá pela produção de ATP pelo próprio  
17 espermatozoide. Durante a criopreservação, alguns açúcares presentes nos  
18 extensores fornecem energia para os espermatozoides, além de auxiliar na  
19 manutenção da membrana plasmática da célula. Em diluentes que visam a  
20 preservação do sêmen bovino, a glucose e frutose são amplamente utilizados.  
21 Contudo, estudos demonstraram que o uso de dissacarídeos, por não serem  
22 permeáveis pelos espermatozoides, interagem com os fosfolipídios de membrana, e  
23 desta forma auxiliam na proteção da membrana plasmática durante a congelação.  
24 Vale destacar que a glucose é um dos componentes da gema de ovo, sendo que esta  
25 substância, além de crioprotoger as células, é também capaz de fornecer energia aos  
26 espermatozoides bovinos (BUSTANI; BAIEE, 2021; KOWALCZYK; KUCZAJ;  
27 CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, 2020).

28 A colheita de sêmen não é um processo estéril, por isso o ejaculado  
29 bovino é passível de contaminações bacterianas. Estudos prévios, apontam que  
30 ejaculados criopreservados com alta carga bacteriana demonstraram redução da  
31 motilidade e viabilidade após a descongelação (BANDAY et al., 2017; KUSTER;  
32 ALTHOUSE, 2016). Assim, é indispensável a adição de antibióticos aos meios  
33 diluentes para criopreservação. Desta forma, os extensores podem incluir antibióticos  
34 como penicilina, gentamicina, estreptomina e ceftiofur (BUSTANI; BAIEE, 2021;

1 RAHEJA et al., 2018).

2 Estudos mais recentes têm buscado formas de implementar e  
3 melhorar os diluentes para criopreservação seminal. Para tal, antioxidantes, como  
4 vitamina E, selênio e melatonina, têm sido adicionados com intuito de reduzir a carga  
5 de ROS produzida pelos espermatozoides e pela morte destas células (BUSTANI;  
6 BAIEE, 2021; KOWALCZYK; KUCZAJ; CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, 2020;  
7 RAHEJA et al., 2018). O impacto da adição de nano partículas de selênio em  
8 extensores de sêmen bovino também foi avaliado, com isso, a molécula na  
9 concentração de 1µg/ml foi capaz de melhorar a qualidade espermática pós  
10 descongelção, refletida no acréscimo de 21,67% de motilidade progressiva em  
11 relação ao grupo controle, além de aumentar a taxa de concepção sob IA (90% de  
12 taxa de concepção no grupo 1µg/ml de nanopartículas de selênio vs. 59% de taxa de  
13 concepção no grupo controle) (KHALIL et al., 2019). Já o resveratrol a 0,05mM, com  
14 sua capacidade de proteger os espermatozoides das ROS, otimizou a qualidade  
15 espermática pós-descongelção, contudo não foi capaz de maximizar a produção de  
16 embriões *in vitro* (ASSUNÇÃO et al., 2021).

17 A importância do diluente se dá, por ser um fator que influencia a  
18 cinética espermática pós descongelção, bem como as taxas de concepção. Ao  
19 comparar a congelação de sêmen bovino com um diluente a base de Tris-gema e um  
20 extensor comercial, notou-se que a taxa de concepção em programa de IATF foi mais  
21 alta nas amostras diluídas em Tris-gema e com concentração de  $50 \times 10^6$  de  
22 espermatozoides (CRESPILHO et al., 2014). O acréscimo do caseinato de sódio a 2%  
23 tem o potencial de estabilizar a membrana espermática além de auxiliar na ligação do  
24 gameta à zona pelúcida do oócito, assim, a adição deste composto potencializou a  
25 motilidade espermáticas pós descongelção sob estresse térmico, além de aumentar  
26 as taxas de blastocistos produzidos *in vitro* e a taxa de prenhez à IATF (DINIZ et al.,  
27 2020).

28 Novas abordagens para os diluentes de criopreservação estão sendo  
29 analisadas, conforme a compreensão acerca dos danos moleculares da  
30 criopreservação é elucidada. Com isso, avaliações de substâncias que melhorem a  
31 viabilidade pós descongelção continuarão a ser pesquisadas (KOWALCZYK;  
32 KUCZAJ; CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, 2020).

### 1 2.2.3 Taxas de Congelação para o Sêmen Bovino

2 As taxas de congelação são extremamente importantes para a  
3 preservação de células espermáticas, pois a viabilidade das células depende da  
4 redução metabólica durante o processo de congelação, o qual deve prevenir o choque  
5 térmico (DIAS et al., 2018; FORERO-GONZALEZ et al., 2012; SALAMON; MAXWELL,  
6 2000). Assim, a congelação espermática pode ser feita de forma lenta, rápida e  
7 ultrarrápida (HEZAVEHEI et al., 2018).

8 Quando os espermatozoides são criopreservados de forma muito  
9 lenta, as células ficam expostas a um meio hipertônico por um período muito longo, e  
10 com isso, ocorre um aumento de eletrólitos intracelular, levando a deformações  
11 morfológicas (GRÖTTER et al., 2019; MERYMAN; WILLIAMS; DOUGLAS, 1977). Em  
12 contrapartida, quando a congelação espermática se dá de forma extremamente  
13 rápida, os espermatozoides não desidratam o suficiente, e com isso, cristais de gelo  
14 intracelular são formados (GRÖTTER et al., 2019).

15 A congelação lenta de espermatozoides bovinos promove a  
16 desidratação das células mais vagarosamente, com intuito de prevenir a formação de  
17 cristais de gelo intracelular (BAIEE et al., 2020). O processo de criopreservação lenta  
18 compreende entre 2 a 3 passos e pode durar por volta de 4 horas, sendo caracterizada  
19 pela redução de 1 a 2°C/minuto entre temperaturas de 5°C a -15°C, seguida da queda  
20 de 4 a 5°C entre os -15 a -79°C (FORERO-GONZALEZ et al., 2012; HEZAVEHEI et  
21 al., 2018; POLGE, 1957).

22 Já a criopreservação rápida, compreende um decréscimo de 30°C a  
23 50°C/minuto, entre 5°C até as doses atingirem temperaturas negativas (DALAL et al.,  
24 2018; KUMAR; MILLAR; WATSON, 2003). Maior motilidade e viabilidade pós  
25 descongelação foi observado em espermatozoides que sofreram redução de  
26 30°C/minuto ou 50°C/minuto entre -5°C e -50°C (KUMAR; MILLAR; WATSON, 2003).

27 A congelação ultrarrápida de espermatozoides consiste em submergir  
28 as palhetas contendo gametas masculinos diretamente em nitrogênio líquido  
29 (GRÖTTER et al., 2019). Uma das vantagens da vitrificação espermática diz respeito  
30 à redução de toxicidade dos crioprotetores e menor estresse osmótico, além de  
31 impedir a capacitação espermática precoce que se dá durante a criopreservação  
32 (GRÖTTER et al., 2019; ISACHENKO et al., 2003). Para espermatozoides bovinos,  
33 esta técnica ainda se encontra em fase experimental, e demonstrou baixos resultados

1 de cinética pós-descongelamento, por isso novos estudos devem ser conduzidos para  
2 aprimorar a metodologia e as temperaturas de descongelamento (BAIEE et al., 2020;  
3 GRÖTTER et al., 2019).

4 Um estudo conduzido por ZOCCA et al. (2021) avaliou os fenômenos  
5 observados no espermatozoides ao longo do processo de criopreservação, assim, a  
6 redução de 0,25°C das amostras a partir de 22°C até estas atingirem 5°C foi  
7 considerada a etapa de refrigeração; em seguida, houve uma fase de equilíbrio, em  
8 que as amostras se mantiveram a 5°C por 1 hora; após ocorreu a congelamento das  
9 amostras, com queda de 20°C/minuto até as doses atingirem -196°C. A partir da  
10 análise, constatou-se que a refrigeração altera o remodelamento do citoesqueleto, já  
11 a fase de equilíbrio é a que menos promove injúrias às células, e finalmente, durante  
12 a congelamento é que ocorrem danos à membrana plasmática e ao potencial  
13 mitocondrial.

14 Destaca-se que as curvas de descongelamento têm tanto impacto sobre  
15 a viabilidade espermática quanto a congelamento (GRÖTTER et al., 2019). Isto se deve  
16 ao fato de que a descongelamento promove o inverso da criopreservação, pois ocorre o  
17 influxo de água para dentro dos espermatozoides (BINIOVÁ et al., 2018). Assim, para  
18 doses destinadas a IA, um recente estudo demonstrou que a descongelamento de doses  
19 à 37°C por 30 segundos obteve maior motilidade dos espermatozoides, em relação a  
20 curvas de descongelamento de 35°C por 40 segundos ou 40°C por 40 segundos  
21 (GOSHME et al., 2021).

#### 22 2.2.4 Comercialização de Sêmen Bovino Criopreservado no Brasil

23 No Brasil, a lei 6.466 de 05 de outubro do ano de 1977, regulamentou  
24 a fiscalização do sêmen de animais domésticos a serem aplicados em inseminação  
25 artificial. Contudo, foi somente numa instrução normativa, datada de 14 de janeiro de  
26 2004, que se instituiu padrões de qualidade mínimos para a comercialização de  
27 sêmen de animais de produção (motilidade mínima de 30% e pelo menos 70% de  
28 espermatozoides com morfologia normal), atendendo as exigências propostas pela  
29 SARC (Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo).

30 Durante o primeiro semestre de 2021 (janeiro a julho) foram  
31 produzidas mais de 10 milhões doses de sêmen bovino no Brasil, sendo um aumento  
32 de 103% em comparação ao mesmo período de 2020 (ASBIA, 2021). Além disso,

1 constatou-se um acréscimo de 35,7% na venda de doses de sêmen bovino entre os  
2 anos de 2020 para 2021 (ASBIA, 2021).

3 Estudos também demonstram a ascensão do uso do sêmen sexado,  
4 em particular do SexedULTRA™ uma nova metodologia de sexagem que agrega  
5 maior concentração espermática, e vem mostrando alta eficiência a campo  
6 (MARQUES et al., 2018).

## 7 2.3 SEXAGEM DO SÊMEN BOVINO

8 A sexagem de espermatozoides bovinos se iniciou nos anos 1990, e  
9 é crescente desde então (REESE, 2021). O aumento da aplicação deste tipo de  
10 sêmen se deve ao fato de produzir conceptos do sexo de interesse para a pecuária, e  
11 assim, reduzir o tempo de melhoramento genético e maximizar os lucros obtidos,  
12 tornando a criação mais rentável (MARQUES et al., 2018; SCOTT; SOUZA;  
13 ARISTIZABAL; et al., 2018; THOMAS et al., 2019).

14 A prática de segregar espermatozoides pelos cromossomos sexuais  
15 se tornou uma realidade devido às diferenças entre os espermatozoides que carregam  
16 o cromossomo X dos que possuem o cromossomo Y. A princípio, são observadas  
17 diferenças físicas entre espermatozoides X e Y, como tamanho, peso, densidade,  
18 velocidade e cargas elétricas presentes na superfície da célula (GARNER; SEIDEL,  
19 2008). Entretanto, a possibilidade de sexar espermatozoides surgiu em decorrência  
20 da diferença de 3 a 4,2% do comprimento total entre os cromossomos X e Y  
21 (GARNER; SEIDEL, 2008; HENDRIKSEN et al., 1996; MORUZZI, 1979; RAHMAN;  
22 PANG, 2020).

### 23 2.3.1 Principais Métodos de Sexagem de Espermatozoides Bovinos

#### 24 2.3.1.1 Citometria de fluxo

25 Por meio das diferenças entre espermatozoides X e Y, constatou-se  
26 que o corante Hoechst 33342 é capaz de permear as células espermáticas e corar o  
27 DNA, e assim, o software de avaliação capta a fluorescência e diferencia de forma  
28 quantitativa os espermatozoides X das células espermáticas Y. Sendo tal segregação

1 realizada por meio da citometria de fluxo (GARNER; SEIDEL, 2008; VISHWANATH;  
2 MORENO, 2018).

3 A principal forma de sexagem de espermatozoides bovinos é a  
4 citometria de fluxo. Esta técnica consiste na diluição da amostra seminal em um meio  
5 aquoso contendo uma sonda fluorescente. Assim, a amostra diluída é captada por um  
6 tubo, em seguida, um a um dos espermatozoides presentes no meio líquido passam  
7 por um laser, excitando a sonda, que por sua vez emite uma fluorescência. Devido a  
8 maior quantidade de DNA presente nos espermatozoides X, estes refletem maior  
9 intensidade de fluorescência sob a sonda Hoechst 33342 (GARNER; EVANS;  
10 SEIDEL, 2013; SCOTT et al., 2018; SEIDEL, 2007).

11 Após a passagem pelo fluxo, os espermatozoides avaliados pelo  
12 software especializado, segrega as células por meio da adição de cargas elétricas. Os  
13 espermatozoides X recebem cargas positivas, enquanto que os espermatozoides Y  
14 são acrescidos de carga negativa. Com isso, na saída do fluxo, os espermatozoides  
15 X são atraídos por um campo elétrico negativo, e as células espermáticas Y seguem  
16 por um campo positivo, sendo cada tipo de espermatozoide captado por um tubo.  
17 Ademais, aos espermatozoides que não foi possível determinar uma carga seguem  
18 um caminho próprio, e por isso, três fluxos são recolhidos (SCHENK; JR, 1999;  
19 SCOTT et al., 2018; SEIDEL, 2007).

20 Por se tratar de uma análise realizada célula por célula de uma  
21 amostra seminal, a sexagem por citometria de fluxo, é lenta, podendo levar mais de  
22 uma hora para ser conduzida. Ressalta-se que as doses de sêmen sexado de forma  
23 convencional, possuem uma concentração baixa, carregando em torno de  $2 \times 10^6$  de  
24 espermatozoides por palheta (GARNER; EVANS; SEIDEL, 2013; SCOTT et al., 2018;  
25 SEIDEL, 2007). A sexagem por meio da citometria de fluxo, pode atingir até 90% de  
26 acurácia (JOHNSON, 2000; RAWAT; SHARMA, 2021).

27 Contudo, a sexagem pode ser um processo nocivo às células  
28 espermáticas. Tanto que, amostras de sêmen sexado apresentam redução em  
29 parâmetros de motilidade, potencial mitocondrial e viabilidade de membrana, quando  
30 comparados à espermatozoides convencionais (não sexados) (CARVALHO et al.,  
31 2018).

### 1 2.3.1.2 SexedULTRA™

2 Nos últimos anos, uma nova técnica de sexagem, chamada  
3 SexedULTRA™, pertencente a empresa Sexing, está se destacando. Trata-se de uma  
4 metodologia patenteada, que aprimorou as metodologias de sexagem já disponíveis  
5 no mercado (MARQUES et al., 2018; THOMAS et al., 2019).

6 Por meio desta tecnologia a sexagem de sêmen bovino se tornou mais  
7 produtiva, ao proporcionar a confecção de até 300 doses de sêmen sexado por dia  
8 (GONZÁLEZ-MARÍN et al., 2018). Uma outra inovação é a maior concentração de  
9 espermatozoides por palheta, podendo chegar até a  $4 \times 10^6$  espermatozoides  
10 (THOMAS et al., 2019).

11 Estudos demonstraram que a viabilidade e integridade do sêmen  
12 SexedULTRA™ são superiores a amostras seminais sexadas de forma convencional  
13 (GONZÁLEZ-MARÍN et al., 2018), além de atingir uma acurácia de 88% de sexagem  
14 na produção de conceptos por IATF (KASIMANICKAM; KASIMANICKAM;  
15 RATZBURG, 2021). Contudo, quando comparado ao sêmen convencional,  
16 empregado na IATF, as doses seminais SexedULTRA™ ainda apresentam taxas de  
17 prenhez significativamente reduzidas, sendo 60% de taxa de prenhez com sêmen  
18 convencional, em comparação à 52% apresentado ao utilizar-se sêmen sexado  
19 (THOMAS et al., 2017, 2019<sup>a</sup>).

### 20 2.3.2 Uso do Sêmen Sexado em Biotécnicas Reprodutivas

21 Dentre os principais benefícios acerca do uso do sêmen sexado em  
22 biotecnologias reprodutivas, dizem respeito à redução de 20% da ocorrência de partos  
23 distócicos em doses sexadas para fêmea, melhoramento genético de novilhas de  
24 reposição de uma propriedade, e a praticidade de produzir bezerros do sexo desejado  
25 (DRAKE et al., 2020; SEIDEL, 2003).

26 Por mais tecnologias que sejam aplicadas na sexagem, o uso do  
27 sêmen convencional continua a gerar taxas de prenhez e concepção mais altas do  
28 que o emprego do uso sexado (SÁ FILHO et al., 2014). Uma meta-análise esclarece  
29 que as taxas de prenhez giram em torno de 43% quando aplicado o sêmen sexado,  
30 contra a média de 56% para doses de sêmen convencional (REESE et al., 2021).

31 Estudos recomendam o uso sêmen sexado na IATF em vacas que

1 apresentem folículo dominante e demonstração de estro, pois estes fatores aumentam  
2 as chances de prenhez utilizando este tipo de sêmen (SÁ FILHO et al., 2012).  
3 Ademais, ao utilizar sêmen sexado na IATF nota-se que novilhas apresentam maiores  
4 taxas de prenhez quando comparadas a vacas (DEJARNETTE; NEBEL; MARSHALL,  
5 2009; PELLEGRINO et al., 2016). Assim, verificou-se semelhança estatística para  
6 taxa de concepção entre sêmen sexado (63,8%) e convencional (61,9%), quando as  
7 fêmeas expressavam estro no momento da IATF (CRITES et al., 2018).

8           Para a produção de embriões, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, o sêmen  
9 sexado também foi empregado. Em fêmeas superovuladas, o sêmen sexado  
10 minimizou em até 35% a produção de embriões viáveis e reduziu em 12% as taxas de  
11 prenhez de embriões transferidos (HALL; GLAZE, 2014; MIKKOLA; ANDERSSON;  
12 TAPONEN, 2015; PEIPPO et al., 2009; SOARES et al., 2011). Uma outra questão  
13 preocupante, é que embriões fertilizados *in vitro* com amostras seminais sexadas  
14 demonstram menores taxas de clivagem e blastocistos, podendo gerar  
15 desenvolvimento embrionário anormal e até mesmo anomalias fenotípicas nos  
16 bezerros (HALL; GLAZE, 2014; REESE et al., 2021).

#### 17 2.4 AVALIAÇÃO DO SÊMEN BOVINO

18           A avaliação do sêmen a ser empregado em técnicas de reprodução  
19 assistida é de extrema importância. A partir destas metodologias é possível identificar  
20 falhas na espermatogênese e reconhecer a qualidade seminal de um animal  
21 (BINSILA, 2019; KASTELIC; THUNDATHIL, 2008; RUELLE et al., 2019).

22           Rotineiramente, as principais avaliações seminais executadas  
23 incluem: avaliação da cinética espermática, podendo ser realizada de forma objetiva  
24 pelo sistema CASA (análise computadorizada de sêmen); morfologia espermática, a  
25 qual analisa alterações conformacionais de células espermáticas, fator que reflete  
26 transtornos durante a formação dos espermatozoides, bem como sua maturação; e  
27 sua morfofuncionalidade, que pode ser avaliada sob citometria de fluxo, gerando  
28 resultados acerca da função mitocondrial e viabilidade espermática (BINSILA, 2019;  
29 GLIOZZI et al., 2017; SERGEANT et al., 2019).

30           Estudos recentes têm demonstrado que a associação de técnicas  
31 promovem resultados mais acurados em relação à fertilidade espermática (GLIOZZI  
32 et al., 2017; SIMONIK et al., 2015). Somente o uso de avaliações de rotina nem

1 sempre são capazes de prever a fertilidade do animal, neste contexto, métodos de  
2 análise molecular do sêmen bovino, como estudo das proteínas espermáticas,  
3 apresentam relações com taxas de fertilidade, que podem vir a agregar na seleção de  
4 touros para programas reprodutivos (CODINA et al., 2015; SERGEANT et al., 2019).

#### 5 2.4.1 Avaliação da Cinética Espermática e o Sistema CASA

6 A princípio, a avaliação do movimento dos espermatozoides era feita  
7 de maneira subjetiva, e classificada em porcentagem para motilidade e o nível de  
8 atividade ou vigor era avaliado em escore de 0 a 5 (CBRA, 2013; HOLT; CUMMINS;  
9 SOLER, 2018). Com o intuito de minimizar potenciais erros gerados pela subjetividade  
10 na análise da cinética espermática em microscopia óptica, adotou-se o uso da técnica  
11 computadorizada (BERGSTEIN; WEISS; BICUDO, 2014; KATHIRAVAN et al., 2011;  
12 SIMONIK et al., 2015).

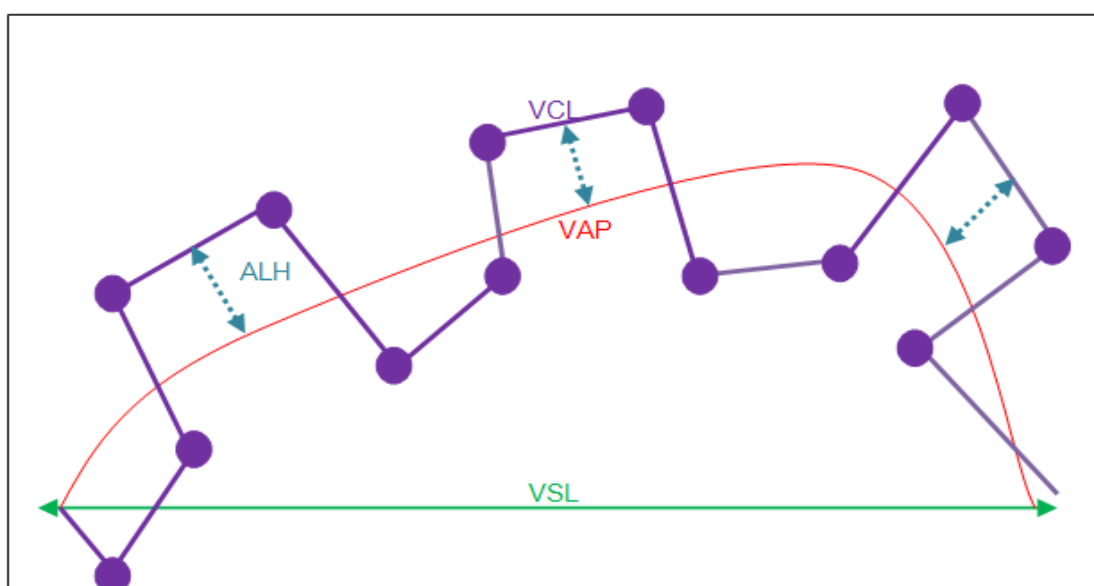
13 Em suma, o sistema CASA consiste numa câmera acoplada à um  
14 microscópio de contraste de fases. As imagens obtidas são enviadas a um  
15 computador, que contém um software capaz de avaliar em tempo real a trajetória dos  
16 espermatozoides (HOLT; CUMMINS; SOLER, 2018; KATHIRAVAN et al., 2011). O  
17 software reconstrói a trajetória de cada uma das células analisadas, devido à  
18 sequência de fotos tiradas a cada segundo do campo selecionado ao digitalizar as  
19 cabeças dos espermatozoides. Vale ressaltar que a acurácia da avaliação do sistema  
20 CASA é dependente do conhecimento do manipulador, além de necessitar aplicação  
21 de um *setup* adequado à análise de cada espécie (KATHIRAVAN et al., 2011;  
22 MUREKEZI et al., 2017; SINGH, A. K.; KUMAR; BISLA, 2021; YÁNIZ et al., 2018).

23 Embora o sistema CASA forneça dados confiáveis sobre a cinética  
24 dos espermatozoides, notam-se algumas desvantagens: devido a existência de  
25 inúmeros softwares para análise espermática computadorizada, não há ainda uma  
26 padronização do *setup* e dos parâmetros avaliados, além disso, pode haver variação  
27 para volume mínimo da amostra entre equipamentos, bem como divergências entre  
28 os tipos de câmara utilizada para esta avaliação, ausência de calibragem para sêmen  
29 de animais de raças diferentes e preparação da amostra (BOMPART et al., 2019).  
30 Fatores estes que tornam menos fidedigna a comparação entre diferentes sistemas e  
31 diferentes laboratórios (KATHIRAVAN et al., 2011; LAMMERS et al., 2014; LU;

1 HUANG; LÜ, 2014; SIMONIK et al., 2015).

2 Os principais parâmetros analisados pelo sistema CASA incluem:  
3 motilidade total (TMOT-%), que afere a quantidade de espermatozoides móveis;  
4 motilidade progressiva (PMOT-%), fornece a quantidade de espermatozoides móveis  
5 com trajetória em linha reta; velocidade de trajeto (VAP- $\mu\text{m/s}$ ), mostra a velocidade da  
6 trajetória média dos espermatozoides; velocidade progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$ ), aponta a  
7 distância entre início e fim da trajetória dividida pelo tempo decorrido; velocidade  
8 curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$ ), apresenta a velocidade da trajetória do espermatozoide;  
9 amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH- $\mu\text{m}$ ), remete à largura média da  
10 oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento; frequência de  
11 batimentos cruzados flagelares (BCF-Hz), aponta a frequência com que a linha da  
12 cabeça espermática atravessa a trajetória celular; reilinearidade (STR-%), resulta da  
13 relação entre VSL e VAP; linearidade (LIN-%), é a razão entre VSL e VCL  
14 (BERGSTEIN; WEISS; BICUDO, 2014; SIMONIK et al., 2015). As características mais  
15 relevantes aferidas pelo sistema CASA encontram-se representadas na Figura 1.

16 **Figura 1:** Representação gráfica da trajetória de um espermatozoide avaliado pelo  
17 sistema CASA, contendo os parâmetros da cinética espermática fornecidos pelo  
18 sistema CASA:



VAP ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidade da trajetória média dos espermatozoides; VSL ( $\mu\text{m/s}$ ): distância entre início e fim da trajetória dividida pelo tempo decorrido; VCL ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidade da trajetória do espermatozoide; ALH ( $\mu\text{m}$ ): largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento  
Fonte: Autor, adaptado de KATHIRAVAN et al. (2011) e SINGH; KUMAR; BISLA (2021).

1                   Devido à objetividade fornecida pelo sistema CASA, alguns estudos  
2 visaram relacionar os parâmetros cinéticos com resultados de fertilidade seminal sob  
3 biotécnicas reprodutivas. O estudo de FARRELL et al. (2002) detectaram resultados  
4 positivos ao correlacionar vários parâmetros do CASA com a fertilidade em sêmen  
5 bovino a fresco. Já na IA convencional, o VCL e a porcentagem de espermatozoides  
6 rápidos demonstraram ser bons preditores da capacidade fertilizante do sêmen  
7 (SUZUKI et al., 2004). Ao avaliar cada parâmetro individualmente, o estudo de NAGY  
8 et al. (2015), evidenciou que os valores de VAP tiveram uma relação positiva com a  
9 fertilidade de espermatozoides bovinos pós descongelção. Em doses inseminantes  
10 utilizadas para a IATF, foi observada relação entre motilidade total e progressiva com  
11 as taxas de fertilidade a campo (OLIVEIRA et al., 2013). Em experimento mais recente  
12 observou-se altas correlação para VCL, VAP, VSL e ALH com as taxas de prenhez de  
13 doses de sêmen bovino pós-descongelção (INANÇ et al., 2018).

#### 14 2.4.2 Avaliação da Morfologia Espermática

15                   A morfologia espermática é capaz de refletir a qualidade da  
16 espermatogênese e maturação espermática, além de retratar influências externas que  
17 possam prejudicar a produção espermática (KAYA et al., 2014). Por isso, nos últimos  
18 30 anos, esta técnica se tornou parte essencial da avaliação seminal (GATIMEL et al.,  
19 2017).

20                   Espermatozoides com anomalias morfológicas são associados à  
21 subfertilidade e até mesmo à infertilidade do touro (SAACKE et al., 1998). Sendo  
22 assim, para que um ejaculado ou uma dose seminal possa ser utilizada em  
23 biotecnologias reprodutivas, o valor máximo de 30% de anormalidades morfológicas  
24 é aceitável na espécie bovina, sendo divididos em defeitos maiores (associados à  
25 espermatogênese) e menores (relacionados à maturação e armazenamento  
26 espermático) (CBRA, 2013).

27                   A revisão conduzida por SAACKE (2008) demonstrou que a morfologia  
28 espermática é uma das melhores avaliações para identificar touros que apresentem  
29 alguma deficiência a ponto de excluí-los da reprodução. Uma outra pesquisa foi capaz  
30 de detectar que espermatozoides de morfologia anormal apresentam valores  
31 significativamente maiores de danos ao DNA celular (ENCISO et al., 2011). Ademais,  
32 foi elucidada uma relação entre a morfologia espermática e a taxa de concepção sob

1 IA convencional (AL-MAKHZOOMI et al., 2008).

2                   Recentemente um longo estudo foi conduzido para associar os  
3 principais defeitos morfológicos a raças de touros, estações no ano e idade dos  
4 animais, e observou-se que existe uma influência da raça, idade e região de criação  
5 dos touros sob a porcentagem de espermatozoides normais, entretanto, nesta análise  
6 as estações do ano não atuaram sob a morfologia de células espermáticas dos  
7 bovinos (FELTON-TAYLOR et al., 2020). Em contrapartida, a literatura, demonstra  
8 que o estresse térmico gera redução da qualidade espermática, bem como o aumento  
9 de anormalidade morfológicas nos espermatozoides (LEITE et al., 2021)

#### 10 2.4.3 Avaliação Morfofuncional dos Espermatozoides Bovinos por meio da Citometria 11 de Fluxo

12                   Com o avanço na aplicação do sêmen bovino congelado para  
13 biotecnologias reprodutivas, e consequente aumento aos danos morfofuncionais  
14 gerados pela criopreservação, buscou-se tecnologias que avaliassem as injúrias  
15 espermáticas de forma mais acurada. Neste contexto, a análise seminal por meio da  
16 citometria de fluxo se tornou uma ferramenta de alta confiabilidade (GLIOZZI et al.,  
17 2017).

18                   A citometria de fluxo se destaca por sua capacidade de analisar uma  
19 grande quantidade de células em um curto espaço de tempo, além de apresentar  
20 resultados altamente precisos (KANNO et al., 2016; VINCENT et al., 2021). A amostra  
21 seminal é diluída em solução fluída e acrescida de sondas fluorescentes, assim ao  
22 passarem por um laser, excita a sonda, que por sua vez tem a emissão de  
23 fluorescência aferida por um *software* (VINCENT et al., 2021).

24                   Cada sonda fluorescente tem intuito de avaliar um aspecto  
25 morfofuncional do espermatozoide. Assim, a diferenciação entre espermatozoides e  
26 debris celulares é feita a partir da sonda SYBR 14, capaz de corar DNA; a probe  
27 Hoechst 33342, também seleciona espermatozoides, porém para uso desta é  
28 necessário que o equipamento possua um laser ultravioleta. Já para a integridade de  
29 acrossoma emprega-se a sonda FITC, a base da planta *Pisum sativum*, que irá  
30 penetrar e corar somente espermatozoides com acrossoma lesado. Para análise de  
31 integridade de membrana utiliza-se Iodeto de propídio (PI), SYBR 14, ou até mesmo  
32 ambos concomitantemente, pois enquanto o PI marca células com membrana

1 danificadas na cor vermelha, a SYBR 14 fluoresce em verde os espermatozoides  
2 viáveis. Para a funcionalidade de mitocôndria existem duas principais sondas: a JC-1  
3 que formam agregados em mitocôndrias que possuam alto potencial de membrana,  
4 emitindo fluorescência na cor laranja; e a outra opção é a Mitotracker, a qual se  
5 difunde passivamente na mitocôndria e se liga ao grupo tiol (SH) das mitocôndrias  
6 ativas. A integridade de DNA também pode ser analisada pela citometria de fluxo por  
7 meio do ensaio da estrutura da cromatina espermática, no qual, os espermatozoides  
8 com DNA fita simples emitem a cor laranja, e os que apresentam DNA fita dupla  
9 emitem a fluorescência em verde. Por fim, também é possível mensurar a produção  
10 de ROS de uma amostra seminal a partir da peroxidação lipídica em espermatozoides,  
11 sendo que a hidroetidina, apresenta a oxidação em citoplasma ao emitir a cor azul, a  
12 MitoSox obtém resultados acerca da formação de O<sub>2</sub> em mitocôndria, enquanto a  
13 sonda CellRox detecta O<sub>2</sub> e o radical hidroxila (DOLNÍK et al., 2019; PEÑA; ORTEGA  
14 FERRUSOLA; MARTÍN MUÑOZ, 2016; VINCENT et al., 2021).

15 Apesar dos laboratórios de análise de sêmen estarem em plena  
16 modificação e modernização, nem todos os locais possuem acesso à tecnologia da  
17 citometria de fluxo. Isto se deve aos altos custos tanto do citômetro de fluxo em si,  
18 quanto das sondas fluorescentes necessária para as avaliações. Ressalta-se ainda  
19 que a manipulação do equipamento e interpretação dos resultados exige um  
20 conhecimento mais aprofundado, sendo imprescindível a realização de cursos e  
21 treinamentos (PEÑA; ORTEGA FERRUSOLA; MARTÍN MUÑOZ, 2016; VINCENT et  
22 al., 2021).

23 A literatura científica indica que somente os parâmetros avaliados  
24 pela citometria de fluxo não fornecem altas correlações com índices de fertilidade  
25 (DEJARNETTE et al., 2021; GLIOZZI et al., 2017; SELLEM et al., 2015). Contudo,  
26 quando a citometria é empregada em associação a outras análises seminais (por  
27 exemplo, a cinética espermática no sistema CASA), os dados fornecidos são mais  
28 acurados com relação a fertilidade em doses de sêmen bovino, podendo auxiliar na  
29 seleção de reprodutores (DEJARNETTE et al., 2021).

#### 30 2.4.4 Análise de Proteínas Espermáticas

31 Para que o espermatozoide fertilize o oócito, é essencial que o gameta  
32 masculino possua motilidade adequada para percorrer o trato genital feminino e passe

1 pela capacitação espermática. Estes eventos se tornam possíveis em razão do  
2 envolvimento de inúmeras proteínas, tanto do próprio espermatozoide, quanto do  
3 plasma seminal (GOVINDARAJU et al., 2012; MOURA et al., 2007). Sendo assim,  
4 devido ao envolvimento das proteínas com a capacidade fertilizante, estudos tem  
5 buscado por polipeptídios de ação específica, que possam ser utilizadas como  
6 biomarcadores (D'AMOURS et al., 2009; REGO et al., 2016).

7           As proteínas presentes no plasma seminal desenvolvem papéis  
8 importantes sobre a fertilidade e congelabilidade de ejaculados bovinos (MEMILI et  
9 al., 2008; REGO et al., 2016). Em touros *Bos indicus* foram detectadas proteínas  
10 presentes no plasma seminal que podem determinar a baixa capacidade de  
11 congelação de um ejaculado, além de estarem envolvidas com a maturação,  
12 capacitação e fertilidade espermática, como a espermedesina e BSP5 (REGO et al.,  
13 2014, 2016). Já em raças taurinas, a abundância das proteínas NAD(P)(+)-arginina,  
14 ADP ribosiltransferase, prosaposina e proteína transmembrana 2, expressas no fluido  
15 seminal, apresentaram alta correlação com a fertilidade de touros (VIANA et al., 2018).

16           Pesquisas têm avaliado divergências no conjunto de proteínas que  
17 compõe os espermatozoides sexados, SCOTT et al. (2018) observaram que oito  
18 proteínas se apresentaram em concentrações diferentes entre os espermatozoides X  
19 e Y, sendo envolvidas na função mitocondrial e produção energética da célula; e  
20 concluíram que os espermatozoides carreadores do cromossomo X possuem maior  
21 perda de proteínas mitocondriais. Na comparação entre espermatozoides sexados  
22 para fêmea com células espermáticas não sexadas, notou-se que a primeira categoria  
23 apresenta menor concentração de proteínas do citoesqueleto espermático  
24 relacionadas na capacitação e reação acrossomal, entretanto, as proteínas de fibra  
25 densa do flagelo eram mais expressas nos espermatozoides sexados, tais diferenças  
26 entre os espermatozoides sexados e não sexados podem ter ocorrido devido  
27 modificação ou degradação de proteínas pós-traducionais (MOSTEK; JANTA;  
28 CIERESZKO, 2020).

29           Outro fator descrito por pesquisadores são as proteínas que podem  
30 estar envolvidas ao mecanismo da motilidade espermática (SINGH et al., 2018;  
31 SOMASHEKAR et al., 2017). Uma destas proteínas, é a HSP70 (proteína do choque  
32 térmico 70), a qual apresentou relação com a motilidade espermática, além de se  
33 expressar em maiores níveis no sêmen bovino a fresco quando comparado ao sêmen  
34 pós descongelação (ZHANG et al., 2015). Já no flagelo espermático contém as

1 AKAP's, proteínas estruturais, que também desempenham um papel essencial na  
2 motilidade dos espermatozoides (BROWN et al., 2003; NARESH e ATREJA, 2015).

3 Na busca por biomarcadores, destacam-se que as proteínas ODF2  
4 (proteína de fibra densa do flagelo tipo 2) e PAWP (proteína da montagem pós  
5 acrossomal da cabeça espermática) demonstraram correlação significativa com a  
6 fertilidade de touros Holandeses sob IA (KAYA et al., 2021). A proteína integrina  $\alpha 5\beta 1$ ,  
7 presente na região pós acrossomal dos espermatozoides bovinos, relacionou-se  
8 positivamente com as taxas de fertilização em programas de PIVE (CASTELLANO et  
9 al., 2021). Outro estudo, aponta que as proteínas ENO1 (enolase-1) e BSP1 (proteína  
10 aglutinante do espermatozoide-1), são potenciais biomarcadores no sêmen bovino,  
11 isto pois, a primeira possui relação positiva à taxas de fertilidade e a segunda por  
12 correlacionar negativamente com a fertilidade de touros (ASLAM et al., 2018).

13 Ainda no contexto de biomarcadores proteicos, o estudo da AKAP4  
14 (proteína ancoradora da quinase-4) e sua precursora (proAKAP4) vêm ganhando  
15 destaque nos últimos anos. A relevância desta proteína em particular se deve à sua  
16 relação com a motilidade espermática e taxas de fertilidade em bovinos (BASTAN;  
17 AKCAY, 2021; RUELLE, et al., 2020).

18 Tabela 1: Principais proteínas espermáticas com potencial de biomarcador de  
19 qualidade e/ou fertilidade do sêmen bovino

<b>Proteína</b>	<b>Localização</b>	<b>Potencial</b>	<b>Referência</b>
HSP 70 e 90 (Heat shock 70 e 90)	Espermatozoides	Relação com a motilidade espermática; maior concentração em touros de alta fertilidade	(KASIMANICKAM et al., 2019; ZHANG et al., 2015)
Histona H1	Espermatozoide	Atua na maturação da cromatina espermática	(KASIMANICKAM et al., 2019)
Integrina $\alpha 5\beta 1$	Região pós acrossomal da cabeça e flagelo do espermatozoide	A quantidade de $\alpha 5\beta 1$ se correlacionou positivamente a taxas de FIV	(CASTELLANO et al., 2021)
H4 acetil retida (Histona 4 acetilada retida)	Cabeça do espermatozoide	Se apresenta em maior quantidade em touros de alta fertilidade	(UGUR et al., 2019)

AK8 (quinase adenilada 8)	Flagelo do espermatozoide	Maior concentração em espermatozoide altamente densos de touros de alta fertilidade; participa do metabolismo energético da célula	(D'AMOURS et al., 2019)
TPI1 (Triosefosfato isomerase 1)	Membrana acrossomais dos espermatozoides	Maior concentração em espermatozoide altamente densos de touros de alta fertilidade; relacionadas à motilidade e na ligação do espermatozoide à zona pelúcida do oócito	(D'AMOURS et al., 2019)
TSPAN8 (Tetraespanina 8)	Membrana plasmática do espermatozoide	Maior concentração em espermatozoide altamente densos de touros de alta fertilidade; indica integridade de membrana espermática	(D'AMOURS et al., 2019)
ENO1 (Enolase 1)	Flagelo espermático	Relacionada à altas taxas de concepção em touros	(ASLAM et al., 2018)
BSP1 (Proteína ligante do espermatozoide 1)	Região acrossomal da cabeça do espermatozoide	Correlaciona-se negativamente às taxas de concepção.	(ASLAM et al., 2018)
ODF2 (proteína de fibra densa externa 2)	Flagelo espermático	Apresenta maior concentração em touros de baixa fertilidade; relacionada à defeitos de cauda	(KAYA et al., 2021)

PAWP (proteína de montagem pós acrossomal de cabeça do espermatozoide)	Bainha pós acrossomal da cabeça do espermatozoide	Aparece em maior concentração em espermatozoides de touros de baixa fertilidade; relacionada a espermatozoides com macrocefalia	(KAYA et al., 2021)
--	---	---	---------------------

1                   As análises e estudos da proteômica espermática podem vir a elucidar  
2 mecanismos ainda incompreendidos, porém que possuem grande importância na  
3 fisiologia dos gametas masculinos (CODINA et al., 2015; OLIVA; DE MATEO;  
4 ESTANYOL, 2009). E a partir daí, será possível identificar biomarcadores de alta  
5 acurácia e compatíveis à fertilidade de touros (ARANGASAMY et al., 2017;  
6 SOMASHEKAR et al., 2017).

## 7 2.5 A PROAKAP4 COMO BIOMARCADOR DE QUALIDADE E FERTILIDADE PARA O SÊMEN 8 BOVINO

9                   As AKAP's (proteínas ancoradoras da quinase) atuam inicialmente  
10 na regulação da gametogênese, tanto no trato reprodutivo masculino quanto feminino  
11 (JUMEAU et al., 2018; LUCONI et al., 2011). A AKAP3 foi localizada em espermátides  
12 ainda arredondadas, enquanto que detectaram a proteína AKAP4 e sua precursora  
13 em espermátides alongadas (JUMEAU et al., 2018; MORETTI et al., 2007).

14                   A AKAP4, juntamente com a AKAP3, são as proteínas estruturais  
15 mais abundantes na bainha fibrosa do flagelo espermático (FRASER, 2017). Sendo  
16 que a proteína AKAP4 tem uma estrutura bem conservada e possui o tamanho de  
17 80kDa, já sua precursora possui 97kDa (LUCONI et al., 2011).

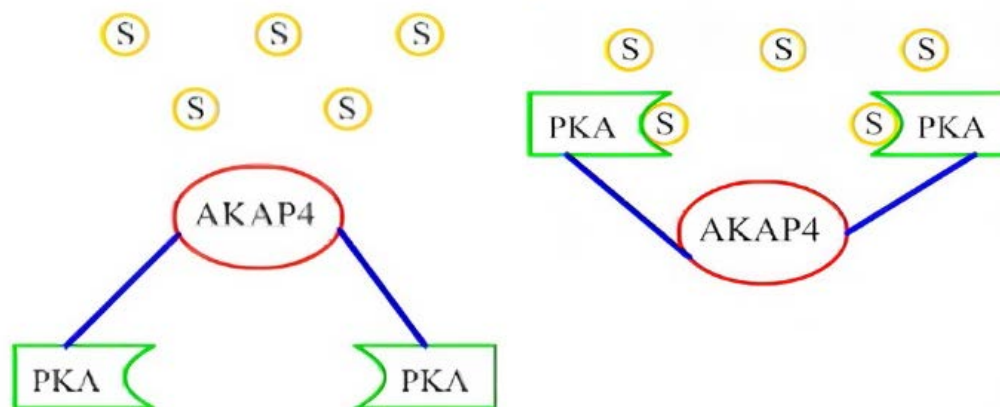
18                   A AKAP4 é uma proteína codificada por um gene ligado ao  
19 cromossomo X, sendo de total herança materna, assim, qualquer problema na  
20 transmissão deste gene, pode acarretar em deficiência da proteína (TURNER et al.,  
21 1999). Desta forma, para que os espermatozoides carreadores do cromossomo Y  
22 também possuam a AKAP4, as espermátides X precisam compartilhar microRNA's do  
23 polipeptídeo e/ou a própria proteína com as espermátides Y, isto se dá por meio de  
24 pontes intercelulares formadas por uma citocinese incompleta, quando ainda fazem

1 parte de sincício clonal (JOHNSON et al., 1997; WEBER; RUSSELL, 1987).

2 A proteína AKAP4 é componente exclusivo do flagelo espermático, e  
3 não é identificada no plasma seminal (DELEHEDDE et al., 2018). Além disso, em  
4 espermatozoides humanos, a AKAP4 foi localizada somente na bainha fibrosa do  
5 flagelo, enquanto que em camundongos foi encontrada apenas na região proximal da  
6 peça principal do espermatozoide (JUMEAU et al., 2018; TURNER et al., 1999).

7 Além da função estrutural, a AKAP4 atua no processo de capacitação  
8 espermática, por estar relacionada à motilidade do espermatozoide (BLOMMAERT et  
9 al., 2018). A AKAP4 é capaz de regular movimentos flagelares ao ancorar as PKA's  
10 (proteína quinase A) na bainha fibrosa, e conduzi-las para próximas de seus  
11 substratos, induzindo a fosforilação das PKA's (BASTAN; AKCAY, 2021; BROWN et  
12 al., 2003; MIKI et al., 2002; MORETTI et al., 2007; TURNER et al., 1999). Por isso,  
13 notou-se que a AKAP4 desempenha um papel na hiperativação espermática,  
14 considerada uma etapa da capacitação espermática (BAKER, 2006).

15 Figura 2: Representação gráfica da AKAP4 e sua função ancoradora da PKA



AKAP4: Proteína ancoradora da quinase A 4; PKA: proteína quinase A; S: substrato.

Fonte: Autor

16 Em homens, foi constatado que a supressão das proteínas AKAP's  
17 prejudicam o início da hiperativação espermática, e desta forma impede a fertilização  
18 do oócito (AITKEN; BAKER, 2008; BAKER, 2006). O estudo conduzido por BEN-NAVI  
19 et al. (2016), realizado com camundongos, concluiu que animais que não possuíam a  
20 proteína AKAP4 apresentaram falhas na motilidade espermática e infertilidade.

21 Devido ao fato de os espermatozoides serem células com transcrição

1 inativa, toda a AKAP4 é produzida durante a espermatogênese. Neste contexto, o  
2 polipeptídeo proAKAP4 é uma forma de armazenamento da AKAP4, embora somente  
3 esta tenha potencial de atividade celular. Sendo assim, pode-se dizer que a  
4 concentração da AKAP4 é modulada pelo estoque de proAKAP4 existente no  
5 espermatozoide, e a conversão de proAKAP4 em AKAP4 só ocorre em  
6 espermatozoides vivos e móveis (DELEHEDDE et al., 2019; JUMEAU et al., 2018;  
7 SERGEANT et al., 2019).

8 Por se tratar de um biomarcador extremamente conservado nos  
9 espermatozoides mamíferos (SERGEANT et al., 2019), a proAKAP4 já foi mensurada  
10 em inúmeras espécies como indicador de qualidade e fertilidade. Assim, estudos  
11 foram previamente conduzidos em células espermáticas de homens (JUMEAU et al.,  
12 2018), garanhões (BLOMMAERT et al., 2018), carneiros (RIESCO et al., 2020), cães  
13 (LANGLADE et al., 2020), dromedários (MALO et al., 2021) e touros *Bos taurus*  
14 (BASTAN; AKCAY, 2021; RUELLE et al., 2020).

15 Em espermatozoides humanos constatou-se que a quantidade de  
16 proAKAP4 somente apresentou correlação positiva com a motilidade espermática  
17 após o teste de gradiente de densidade e da separação do plasma seminal. No mesmo  
18 estudo também notaram que a AKAP4 pode ser ativada com o intuito de resgatar a  
19 motilidade espermática após a centrifugação, elucidando mais uma vez que sua  
20 precursora funciona como uma reserva proteica (JUMEAU et al., 2018). Ainda em  
21 sêmen humano, descobriu-se que homens fumantes apresentam menor quantidade  
22 de proAKAP4, e conseqüentemente, sêmen de qualidade reduzida (DELEHEDDE et  
23 al., 2019)

24 Em sêmen equino, encontrou-se uma correlação positiva entre a  
25 concentração de proAKAP4 e motilidade total e progressiva (BLOMMAERT et al.,  
26 2018). Em espermatozoides ovinos, as relações positivas com a motilidade total,  
27 motilidade progressiva e viabilidade espermáticas foram detectadas, e houve  
28 correlação negativa entre a proAKAP4 e taxa de apoptose espermática (RIESCO et  
29 al., 2020).

30 Acerca da avaliação da proAKAP4 em sêmen bovino, duas pesquisas  
31 foram previamente conduzidas, utilizando amostras seminais de *Bos taurus*. A  
32 princípio, BASTAN e AKCAY (2021) descreveram correlações positivas entre a  
33 motilidade espermática e a expressão de proAKAP4 (motilidade total:  $r=0.52$  e  
34 motilidade progressiva:  $r=0.69$ ), além disso, foram identificadas relações da

1 precursora com outros parâmetros cinéticos (VSL e VCL). O estudo de RUELLE et al.  
2 (2020) reforçou a correlação da proAKAP4 com a cinética espermática, e ainda  
3 conferiu a relação entre a proAKAP4 com taxas de não retorno ao estro após 90 dias  
4 da IA.

5                   A literatura compila resultados positivos para a relação da proAKAP4  
6 à parâmetros que expressam a qualidade espermática, além da associação da  
7 precursora com taxas de prenhez em biotecnologias reprodutivas (BASTAN; AKCAY,  
8 2021; BLOMMAERT et al., 2018; RIESCO et al., 2020; RUELLE et al., 2020). Por isso,  
9 acredita-se que a proAKAP4 possa ser utilizada como um marcador de fertilidade  
10 confiável para o sêmen bovino (RUELLE et al., 2019). No entanto, existe uma lacuna  
11 na literatura a respeito das concentrações de proAKAP4 em espermatozoides bovinos  
12 *Bos indicus*, sua expressão em células espermáticas sexadas e a relação com taxas  
13 de prenhez obtidas em programas de IATF.

### 1 3 REFERÊNCIAS

- 2 AITKEN, R. John; BAKER, Mark A. The role of proteomics in understanding sperm cell  
3 biology. **International Journal of Andrology**, vol. 31, no. 3, p. 295–302, 2008.  
4 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00851.x>.
- 5 AL-MAKHZOOMI, A.; LUNDEHEIM, N.; HÅÅRD, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.  
6 Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden.  
7 **Theriogenology**, vol. 70, no. 4, p. 682–691, 2008.  
8 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.049>.
- 9 ALFIERI, Amauri Alcindo; LEME, Raquel Arruda; AGNOL, Alais Maria Dall; ALFIERI,  
10 Alice Fernandes. Sanitary program to reduce embryonic mortality associated with  
11 infectious diseases in cattle. **Animal Reproduction**, vol. 16, no. 3, p. 386–393, 2019.  
12 <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0073>.
- 13 AMANN, R. P.; DEJARNETTE, J. M. Impact of genomic selection of AI dairy sires on  
14 their likely utilization and methods to estimate fertility: A paradigm shift.  
15 **Theriogenology**, vol. 77, no. 5, p. 795–817, 2012. DOI  
16 10.1016/j.theriogenology.2011.09.002. Available at:  
17 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.002>.
- 18 ARANGASAMY, Arunachalam; SOMASHEKAR, Lakshminarayana; PARTHIPAN,  
19 Sivashanmugam; RAVINDRA, Janivara Parameswaraiyah; SELVARAJU, Sellappan;  
20 SIVARAM, Muniandy. Spermatozoal transcripts expression levels are predictive of  
21 semen quality and conception rate in bulls ( *Bos taurus* ). **Theriogenology**, vol. 98, p.  
22 41–49, 2017. DOI 10.1016/j.theriogenology.2017.04.042. Available at:  
23 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.042>.
- 24 ASBIA. Index Asbia 1º Semestre 2021. **ASBIA**, , p. 1–37, 2021. Available at:  
25 [http://philcarto.free.fr/01\\_bienvenue/01\\_bienvenuePT.html](http://philcarto.free.fr/01_bienvenue/01_bienvenuePT.html).
- 26 ASSUNÇÃO, Carolina Marinho; MENDES, Vivian Rachel Araujo; BRANDÃO, Felipe  
27 Zandonadi; BATISTA, Ribrio Ivan Tavares Pereira; SOUZA, Eliza Diniz; CARVALHO,  
28 Bruno Campos de; QUINTÃO, Carolina Capobiango Romano; RAPOSO, Nadia  
29 Rezende Barbosa; CAMARGO, Luiz Sergio Almeida. Effects of resveratrol in bull  
30 semen extender on post-thaw sperm quality and capacity for fertilization and embryo  
31 development. **Animal Reproduction Science**, vol. 226, no. January, 2021.  
32 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106697>.
- 33 AYRES, Henderson; FERREIRA, Roberta Machado; DE SOUZA TORRES-JÚNIOR,  
34 José Ribamar; DEMÉTRIO, Clarice Garcia Borges; DE LIMA, César Gonçalves;  
35 BARUSELLI, Pietro Sampaio. Validation of body condition score as a predictor of  
36 subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. **Livestock Science**, vol. 123, no. 2–3,  
37 p. 175–179, 2009. DOI 10.1016/j.livsci.2008.11.004. Available at:  
38 <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2008.11.004>.
- 39 BAIEE, Falah; AL-WAHAB, Ali; FITRI, Wan-Nor; HARON, Abd; BUSTANI, Ghadeer.  
40 Effect of vitrification on spermatozoa quality in bull semen. **Eurasian Journal of**  
41 **Biosciences**, vol. 14, no. November 2019, p. 3897–3904, 2020. .

- 1 BAKER, M. A. Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved  
2 in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. **Journal of Cell**  
3 **Science**, vol. 119, no. 15, p. 3182–3192, 2006. <https://doi.org/10.1242/jcs.03055>.
- 4 BANDAY, M N; LONE, F A; RASOOL, F; RATHER, H A; RATHER, M A. Does natural  
5 honey act as an alternative to antibiotics in the semen extender for cryopreservation of  
6 crossbred ram semen? **Iranian journal of veterinary research**, vol. 18, no. 4, p. 258–  
7 263, 2017. DOI 10.22099/ijvr.2017.4624. Available at:  
8 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29387098>  
9 <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5767632>.
- 10 BARUSELLI, Pietro S. Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal.  
11 **Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP**, vol. 5, p. 2, 2021. Available at:  
12 <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>.
- 13 BARUSELLI, Pietro Sampaio; DE SOUZA, Alexandre Henryli; DE SÁ FILHO, Manoel  
14 Francisco; MARQUES, Marcio Oliveira; SALES, Jose Nélio de Sousa. Genetic market  
15 in cattle (Bull, AI, FTAI, MOET and IVP): Financial payback based on reproductive  
16 efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, vol. 15, no. 3, p.  
17 247–255, 2018. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0091>.
- 18 BASTAN, Ilktan; AKCAY, Ergun. Quality assessment of frozen bull semen with the  
19 precursor kinase anchor protein 4 biomarker. no. April, p. 1–8, 2021.  
20 <https://doi.org/10.1111/and.14164>.
- 21 BERGSTEIN, T G; WEISS, R R; BICUDO, S D. Técnicas de análise de sêmen. , p.  
22 189–194, 2014. .
- 23 BINIOVÁ, Zuzana; STÁDNÍK, Luděk; DOLEŽALOVÁ, Martina; DUCHÁČEK, Jaromír.  
24 Effect of thawing method on bull sperm survival in ejaculates frozen in 4 ml and 8 ml  
25 volumes. **Czech Journal of Animal Science**, vol. 63, no. 10, p. 399–407, 2018.  
26 <https://doi.org/10.17221/117/2018-CJAS>.
- 27 BINSILA BK, Selvaraju. Molecular advances in semen quality assessment and  
28 improving fertility in bulls - A Review. vol. 39, no. June, 2019. .
- 29 BLOMMAERT, D.; SERGEANT, N.; DELEHEDDE, M.; FRANCK, T.; LEJEUNE, J.P.;  
30 SERTEYN, D. Significant Correlation Between the proAKAP4 Concentration and the  
31 Total and Progressive Motility in Stallion Sperm After Thawing. **Journal of Equine**  
32 **Veterinary Science**, vol. 66, p. 43, 2018. DOI 10.1016/j.jevs.2018.05.019. Available  
33 at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2018.05.019>.
- 34 BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial  
35 insemination in beef cattle. **Animal**, vol. 8, no. SUPPL. 1, p. 144–150, 2014.  
36 <https://doi.org/10.1017/S1751731114000822>.
- 37 BÓ, Gabriel A.; BARUSELLI, Pietro Sampaio; MANPLETOFT, R. J. Synchronization  
38 techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle.  
39 **Animal Reproduction**, vol. 10, no. 3, p. 137–142, 2013. .
- 40 BÓ, Gabriel A.; HUGUENINE, Emilio; DE LA MATA, José Javier; NÚÑEZ-OLIVERA,  
41 Richard; BARUSELLI, Pietro S.; MENCHACA, Alejo. Programs for fixed-time artificial

- 1 insemination in South American beef cattle. **Animal Reproduction**, vol. 15, no. Irrs, p.  
2 952–962, 2018. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0025>.
- 3 BO, Gabriel; BARUSELLI, P. Programas De Inseminacion Artificial Y Transferencia  
4 De. **Biotecnologia Da Reprodução Em Bovinos**, vol. 17, no. 60, p. 56–81, 2004. .
- 5 BOMPART, Daznia; VÁZQUEZ, Rubén F.; GÓMEZ, Rubén; VALVERDE, Anthony;  
6 ROLDÁN, Eduardo R.S.; GARCÍA-MOLINA, Almudena; SOLER, Carles. Combined  
7 effects of type and depth of counting chamber, and rate of image frame capture, on  
8 bull sperm motility and kinematics. **Animal Reproduction Science**, vol. 209, no.  
9 August, p. 106169, 2019. DOI 10.1016/j.anireprosci.2019.106169. Available at:  
10 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106169>.
- 11 BOTTINO, M. P.; SIMÕES, L. M.S.; SILVA, L. A.C.L.; GIROTTO, R. W.; SCANDIUZZI,  
12 L. A.; MASSONETO, J. P.M.; BARUSELLI, P. S.; SOUZA, J. C.; SALES, J. N.S. Effects  
13 of eCG and FSH in timed artificial insemination treatment regimens on estrous  
14 expression and pregnancy rates in primiparous and multiparous *Bos indicus* cows.  
15 **Animal Reproduction Science**, vol. 228, no. April, 2021.  
16 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106751>.
- 17 BRIGGS, Reganne; ROOD, Kerry A. Heat Stress and Reproduction in Beef Cattle. vol.  
18 72, 2003. .
- 19 BRITO, Leonardo F.C.; SILVA, Antonio E.D.F.; BARBOSA, Rogerio T.; UNANIAN,  
20 Maria M.; KASTELIC, John P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen  
21 quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls.  
22 **Animal Reproduction Science**, vol. 79, no. 1–2, p. 1–15, 2003.  
23 [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00082-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00082-4).
- 24 BROWN, Paula R.; MIKI, Kiyoshi; HARPER, Deborah B.; EDDY, Edward M. A-kinase  
25 anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum.  
26 **Biology of Reproduction**, vol. 68, no. 6, p. 2241–2248, 2003.  
27 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013466>.
- 28 BROWN, Paula R.; MIKI, Kiyoshi; HARPER, Deborah B.; EDDY, Edward M. A-Kinase  
29 Anchoring Protein 4 Binding Proteins in the Fibrous Sheath of the Sperm Flagellum.  
30 **Biology of Reproduction**, vol. 68, no. 6, p. 2241–2248, 2004.  
31 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013466>.
- 32 BUSTANI, Ghadeer Sabah; BAIEE, Falah Hasan. Semen extenders: An evaluative  
33 overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. **Veterinary**  
34 **World**, vol. 14, no. 5, p. 1220–1233, 2021.  
35 <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233>.
- 36 CARVALHO, José de Oliveira; SARTORI, Roberto; RODELLO, Leandro; MOURÃO,  
37 Gerson Barreto; BICUDO, Sony Dimas; MARGOT, Margot A. Flow cytometry sex  
38 sorting affects bull sperm longevity and compromises their capacity to bind to oviductal  
39 cells. **Livestock Science**, vol. 207, no. October 2017, p. 30–37, 2018. DOI  
40 10.1016/j.livsci.2017.11.005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.11.005>.
- 41 CASTELLANO, L.; ARROYO-SALVO, C. A.; CHIARANTE, N.; ALONSO, C. A.I.;  
42 LOTTERO-LECONTE, R. M.; VERNAZ, Z. J.; NAVARRO, M.; MUTTO, A.; OSYCKA-

- 1 SALUT, C.; RIBEIRO, M. L.; PEREZ-MARTINEZ, S. Evaluation of  $\alpha 5\beta 1$  integrin as a  
2 candidate marker for fertility in bull sperm samples. **Theriogenology**, vol. 168, p. 66–  
3 74, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.04.001>.
- 4 CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3rd ed. Belo  
5 Horizonte: [s. n.], 2013.
- 6 CODINA, M.; ESTANYOL, J.M.; FIDALGO, M.J.; BALLESCÀ, J.L.; OLIVA, R.  
7 Advances in sperm proteomics: Best-practise methodology and clinical potential.  
8 **Expert Review of Proteomics**, vol. 12, no. 3, p. 255–277, 2015. DOI  
9 10.1586/14789450.2015.1040769. Available at:  
10 [http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L604](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L604467307%0Ahttp://dx.doi.org/10.1586/14789450.2015.1040769)  
11 [467307%0Ahttp://dx.doi.org/10.1586/14789450.2015.1040769](http://dx.doi.org/10.1586/14789450.2015.1040769).
- 12 COLAZO, Marcos G.; MAPLETOFT, Reuben J. A review of current timed-AI (TAI)  
13 programs for beef and dairy cattle. **Canadian Veterinary Journal**, vol. 55, no. 8, p.  
14 772–780, 2014. .
- 15 CREPALDI, G. A.; SALES, J. N.S.; GIROTTO, R. W.; CARVALHO, J. G.S.;  
16 BARUSELLI, P. S. Effect of induction of ovulation with estradiol benzoate at P4 device  
17 removal on ovulation rate and fertility in *Bos indicus* cows submitted to a TAI protocol.  
18 **Animal Reproduction Science**, vol. 209, no. August, 2019.  
19 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106141>.
- 20 CRESPILO, A. M.; PAPA, F. O.; SÁ FILHO, M. F.; GUASTI, P. N.; DELL’AQUA, J.  
21 A.; VASCONCELOS, J. L.M.; NOVAES, J. L.C.; MARTINS, A. The influence of  
22 insemination dose on pregnancy per fixed-time artificial insemination in beef cows is  
23 affected by semen extender. **Animal Reproduction**, vol. 11, no. 1, p. 3–10, 2014. .
- 24 CRITES, B. R.; VISHWANATH, R.; ARNETT, A. M.; BRIDGES, P. J.; BURRIS, W. R.;  
25 MCLEOD, K. R.; ANDERSON, L. H. Conception risk of beef cattle after fixed-time  
26 artificial insemination using either SexedUltra™ 4M sex-sorted semen or conventional  
27 semen. **Theriogenology**, vol. 118, p. 126–129, 2018. DOI  
28 10.1016/j.theriogenology.2018.05.003. Available at:  
29 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.003>.
- 30 D’AMOURS, Olivier; CALVO, Ézéquiél; BOURASSA, Sylvie; VINCENT, Patrick;  
31 BLONDIN, Patrick; SULLIVAN, Robert. Proteomic markers of low and high fertility  
32 bovine spermatozoa separated by Percoll gradient. **Molecular Reproduction and**  
33 **Development**, vol. 86, no. 8, p. 999–1012, 2019. <https://doi.org/10.1002/mrd.23174>.
- 34 D’AMOURS, Olivier; FORTIER, Marlène; LECLERC, Pierre; SULLIVAN, Robert;  
35 FRENETTE, Gilles. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from  
36 bulls with different fertility indexes. **Reproduction**, vol. 139, no. 3, p. 545–556, 2009.  
37 <https://doi.org/10.1530/rep-09-0375>.
- 38 D’OCCHIO, Michael J.; BARUSELLI, Pietro S.; CAMPANILE, Giuseppe. Influence of  
39 nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A  
40 review. **Theriogenology**, vol. 125, p. 277–284, 2019. DOI  
41 10.1016/j.theriogenology.2018.11.010. Available at:  
42 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.010>.

- 1 DALAL, Jasmer; KUMAR, Ajeet; DUTT, Ravi; SINGH, Gyan; CHANDOLIA, R.K.  
2 Different Cooling Rate for Cryopreservation of Semen in Various Livestock Species: A  
3 Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, vol.  
4 7, no. 08, p. 1903–1911, 2018. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.708.219>.
- 5 DE SOUZA SARTORI, Gabriela; PERUCCHI, Gabriel Rodrigo Hass; PEREIRA, Diego  
6 Rodrigues; FRIAS, Danila Fernanda Rodrigues. Analysis of the efficiency of active  
7 immunization against IBR, BVD and leptospirosis in increasing pregnancy rate in FTAI  
8 protocols. **Acta Veterinaria Brasilica**, vol. 14, no. 2, p. 92–98, 2020.  
9 <https://doi.org/10.21708/AVB.2020.14.2.9115>.
- 10 DEJARNETTE, J. M.; HARSTINE, B. R.; MCDONALD, K.; MARSHALL, C. E.  
11 Commercial application of flow cytometry for evaluating bull sperm. **Animal**  
12 **Reproduction Science**, no. August, p. 106838, 2021. DOI  
13 10.1016/j.anireprosci.2021.106838. Available at:  
14 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106838>.
- 15 DEJARNETTE, J. M.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E. Evaluating the success of sex-  
16 sorted semen in US dairy herds from on farm records. **Theriogenology**, vol. 71, no. 1,  
17 p. 49–58, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.042>.
- 18 DELEHEDDE, M; BLOMMAERT, D; JOUY, N; SCABELLO, J; MIERSMAN, H;  
19 FRANCK, T; SERTEYN, D; MITCHELL, V; SERGEANT, N; LINALUX, France; UMR,  
20 S. Delehedde et al. - Unknown - Concentration of proAKAP4 as a pertinent read-out of  
21 sperm quality in mammals - Unknown. , p. 4308, [s. d]. .
- 22 DELEHEDDE, Maryse; BLOOMAERT, Didier; JOUY, Nathalie; SCABELLO, Julie;  
23 MIERSMAN, Hortense; FRANCK, Thierry; SERTEYN, Didier; MITCHELL, Valérie;  
24 SERGEANT, Nicolas. Concentration of proAKAP4 as a pertinent read-out of sperm  
25 quality in mammals. **Animal Reproduction Science**, vol. 194, no. July, p. e24, 2018.  
26 DOI 10.1016/j.anireprosci.2018.04.053. Available at:  
27 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.053>.
- 28 DELEHEDDE, Maryse; CARRACEDO, Sara; SELLESLAGH, Margaux;  
29 EDDARKAOUI, Sabiha; AMIRAT-BRIAND, Lamia; SERGEANT, Nicolas. ProAKAP4  
30 polypeptide as a biomarker of sperm functionality and male fertility disorders  
31 Abbreviations: AKAP4: A-kinase anchor protein 4; PKA: protein kinase A.  
32 **International Journal of Gynecology and Reproductive Sciences Int J Gynecol**  
33 **and Reprod Sci**, vol. 2, no. 1, p. 13–19, 2019. Available at:  
34 [www.ologypress.com/submit-article](http://www.ologypress.com/submit-article).
- 35 DELLAQUA, Jose Antonio; CRESPILOHO, Andre Maciel; DELLAQUA-FREITAS,  
36 Camila Paula; GUASTI, Priscilla; ZAHN, Fabiola Soares; PAPA, Frederico Ozanam.  
37 Influence of Seminal Quality and Bull on Fertility Rates in Fixed-Time Artificial  
38 Insemination Programs. **Biology of Reproduction**, vol. 81, no. Supl 1, p. 628, 2009.  
39 .
- 40 DIAS, Erika Aline Ribeiro; CAMPANHOLI, Suzane Peres; ROSSI, Guilherme Fazan;  
41 FREITAS DELL'AQUA, Camila de Paula; DELL'AQUA, José Antonio; PAPA, Frederico  
42 Ozanam; ZORZETTO, Mariana Furtado; DE PAZ, Claudia Cristina Paro; OLIVEIRA,  
43 Letícia Zoccolaro; MERCADANTE, Maria Eugênia Zerlotti; MONTEIRO, Fabio Morato.

- 1 Evaluation of cooling and freezing systems of bovine semen. **Animal Reproduction**  
2 **Science**, vol. 195, no. May, p. 102–111, 2018. DOI 10.1016/j.anireprosci.2018.05.012.  
3 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.012>.
- 4 DINIZ, Jefferson Viana Alves; SATRAPA, Rafael Augusto; SEGABINAZZI, Lorenzo  
5 Garrido T.M.; CARNEIRO, João Alexandre Matos; OBA, Eunice; PAPA, Federico  
6 Ozanam; DELL'AQUA, Camila de Paula Freitas; LOUREIRO, Bárbara; JUNIOR, José  
7 Antonio Dell Aqua. Sodium caseinate improves longevity and fertility of frozen bull  
8 semen. **Theriogenology**, vol. 154, p. 59–65, 2020.  
9 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.028>.
- 10 DOLNÍK, Michal; MUDROŇOVNÁ, Dagmar; POŠIVÁK, Ján; LAZAR, Gabriel;  
11 MUDROŇ, Pavol. Flow cytometry in assessment of sperm integrity and functionality –  
12 a review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, vol. 88, p. 169–175, 2019. .
- 13 DRAKE, E.; HOLDEN, S. A.; AUBLET, V.; DOYLE, R. C.; MILLAR, C.; MOORE, S. G.;  
14 MAICAS, C.; RANDI, F.; CROMIE, A. R.; LONERGAN, P.; BUTLER, S. T. Evaluation  
15 of delayed timing of artificial insemination with sex-sorted sperm on pregnancy per  
16 artificial insemination in seasonal-calving, pasture-based lactating dairy cows. **Journal**  
17 **of Dairy Science**, vol. 103, no. 12, p. 12059–12068, 2020. DOI 10.3168/jds.2020-  
18 18847. Available at: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2020-18847>.
- 19 ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S. D.; SARASA, J.; FERNÁNDEZ, J. L.;  
20 GOSÁLVEZ, J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to  
21 sperm DNA damage. **Theriogenology**, vol. 76, no. 1, p. 23–32, 2011.  
22 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.034>.
- 23 FARIAS, Lucas Balinhas; BARBOSA, Matheus Wrege Meireles; LOPES, Matheus  
24 Gomes; FERNANDES, Gabriel Weizenmann; XAVIER, Ana Laura Aita; FISCHER,  
25 Gustavo; BRAUNER, Cássio Cassal. Gestation Rate in Beef Cows with Different  
26 Calving Orders Submitted to FTAI Protocol: Effects of Body Condition, Number of  
27 Progesterone Intravaginal Device Uses and Bull. **Journal of Agricultural Studies**,  
28 vol. 8, no. 2, p. 832, 2020. <https://doi.org/10.5296/jas.v8i2.17002>.
- 29 FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOTE, R.H. Quantification of  
30 bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and  
31 the relationship to fertility. **Theriogenology**, vol. 49, no. 4, p. 871–879, 2002.  
32 [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00036-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00036-3).
- 33 FELTON-TAYLOR, Judy; PROSSER, Kelli A.; HERNANDEZ-MEDRANO, Juan H.;  
34 GENTILI, Sheridan; COPPING, Katrina J.; MACROSSAN, Paula E.; PERRY, Viv E.A.  
35 Effect of breed, age, season and region on sperm morphology in 11,387 bulls  
36 submitted to breeding soundness evaluation in Australia. **Theriogenology**, vol. 142,  
37 p. 1–7, 2020. DOI 10.1016/j.theriogenology.2019.09.001. Available at:  
38 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.001>.
- 39 FERNANDEZ-NOVO, Aitor; PÉREZ-GARNELO, Sonia S.; VILLAGRÁ, Arantxa;  
40 PÉREZ-VILLALOBOS, Natividad; ASTIZ, Susana. The effect of stress on reproduction  
41 and reproductive technologies in beef cattle—A review. **Animals**, vol. 10, no. 11, p. 1–  
42 23, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10112096>.

- 1 FORERO-GONZALEZ, R. A.; CELEGHINI, E. C.C.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A.  
2 F.C.; BRESSAN, F. F.; ARRUDA, R. P. Effects of bovine sperm cryopreservation using  
3 different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and  
4 mitochondrial membranes. **Andrologia**, vol. 44, no. SUPPL.1, p. 154–159, 2012.  
5 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01154.x>.
- 6 FRASER, Leyland. Markers for Sperm Freezability and Relevance of Transcriptome  
7 Studies in Semen Cryopreservation: A Review. **Theriogenology**, 2017.  
8 <https://doi.org/10.5772/intechopen.68651>.
- 9 GARNER, D. L.; SEIDEL, G. E. History of commercializing sexed semen for cattle.  
10 **Theriogenology**, vol. 69, no. 7, p. 886–895, 2008.  
11 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.006>.
- 12 GARNER, Duane L; EVANS, K Michael; SEIDEL, George E. Sex-Sorting Sperm Using  
13 Flow Cytometry / Cell Sorting. **Methods in molecular biology**. [S. l.: s. n.], 2013. vol.  
14 927, p. 279–295. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0>.
- 15 GATIMEL, N.; MOREAU, J.; PARINAUD, J.; LÉANDRI, R. D. Sperm morphology:  
16 assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017.  
17 **Andrology**, vol. 5, no. 5, p. 845–862, 2017. <https://doi.org/10.1111/andr.12389>.
- 18 GEARY, T. W.; WHITTIER, J. C.; HALLFORD, D. M.; MACNEIL, M. D. Calf removal  
19 improves conception rates to the Ovsynch and CO-Synch protocols. **Journal of**  
20 **Animal Science**, vol. 79, no. 1, p. 1–4, 2001. <https://doi.org/10.2527/2001.7911>.
- 21 GLIOZZI, T. M.; TURRI, F.; MANES, S.; CASSINELLI, C.; PIZZI, F. The combination  
22 of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in  
23 cryopreserved bull semen. **Animal**, , p. 1–8, 2017.  
24 <https://doi.org/10.1017/S1751731117000684>.
- 25 GONZÁLEZ-MARÍN, C.; GÓNGORA, C. E.; GILLIGAN, T. B.; EVANS, K. M.;  
26 MORENO, J. F.; VISHWANATH, R. In vitro sperm quality and DNA integrity of  
27 SexedULTRA™ sex-sorted sperm compared to non-sorted bovine sperm.  
28 **Theriogenology**, vol. 114, p. 40–45, 2018.  
29 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.03.025>.
- 30 GONZÁLEZ MARÍN, Clara. **Development of a methodology that improves sex-**  
31 **sorted bovine sperm integrity and fertility**. 2020. Universidad Autónoma de Madrid,  
32 2020. Available at: <http://hdl.handle.net/10486/692004>.
- 33 GOSHME, Shenkute; ASFAW, Tadiws; DEMISS, Chekol; BESUFEKAD, Shanbel.  
34 Evaluation of motility and morphology of frozen bull semen under different thawing  
35 methods used for artificial insemination in North Shewa zone, Ethiopia. **Heliyon**, vol.  
36 7, no. 10, p. e08183, 2021. DOI 10.1016/j.heliyon.2021.e08183. Available at:  
37 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08183>.
- 38 GOTTSCHALL, Carlos Santos; ROCHA, Leonardo. Taxa de prenhez de novilhas de  
39 corte submetidas à IATF com protocolo a base de benzoato de estradiol ou Ovsynch  
40 modificado Reproductive performance in beef heifer submitted to FTAI with protocol  
41 BE-base or Ovsynch modified Tasa de preñez de novillas de ca. **Pubvet - Medicina**  
42 **Veterinária e Zootecnia**, vol. 12, no. 9, p. 1–6, 2018. .

- 1 GOVINDARAJU, Aruna; DOGAN, Sule; RODRIGUEZ-OSORIO, Nelida; GRANT,  
2 Kamilah; KAYA, Abdullah; MEMILI, Erdogan. Delivering value from sperm proteomics  
3 for fertility. **Cell and Tissue Research**, vol. 349, no. 3, p. 783–793, 2012.  
4 <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1452-2>.
- 5 GRÖTTER, Laura Guadalupe; CATTANEO, Luciano; MARINI, Patricia Estela;  
6 KJELLAND, Michael E.; FERRÉ, Luis B. Recent advances in bovine sperm  
7 cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization.  
8 **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 54, no. 4, p. 655–665, 2019.  
9 <https://doi.org/10.1111/rda.13409>.
- 10 HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in Farm Animals**. 7th ed. [S. l.: s. n.], 2016.  
11 <https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch1>.
- 12 HALL, J. B.; GLAZE, J. B. System application of sexed semen in beef cattle.  
13 **Professional Animal Scientist**, vol. 30, no. 3, p. 279–284, 2014. DOI  
14 10.15232/S1080-7446(15)30118-2. Available at: [http://dx.doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30118-2](http://dx.doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30118-2).  
15
- 16 HANSEN, P. J.; DROST, M.; RIVERA, R.M.; PAULA-LOPES, F.F.; AL-KATANANI, Y.  
17 M.; KRINGINGER, C.E.; CHASE, C.C. Adverse impact of heat stress on embryo  
18 production. **Theriogenology**, vol. 55, no. 00, p. 91–103, 2001. .
- 19 HENDRIKSEN, Peter J.M.; WELCH, Glenn R.; GROOTEGOED, J. Anton; VAN DER  
20 LENDE, Tette; JOHNSON, Lawrence A. Comparison of detergent-solubilized  
21 membrane and soluble proteins from flow cytometrically sorted X- and Y-chromosome  
22 bearing porcine spermatozoa by high resolution 2-D electrophoresis. **Molecular**  
23 **Reproduction and Development**, vol. 45, no. 3, p. 342–350, 1996.  
24 [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199611\)45:3<342::AID-MRD11>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199611)45:3<342::AID-MRD11>3.0.CO;2-0).
- 25 HEZAVEHEI, Maryam; SHARAFI, Mohsen; KOUCHESFAHANI, Homa Mohseni;  
26 HENKEL, Ralf; AGARWAL, Ashok; ESMAEILI, Vahid; SHAHVERDI, Abdolhossein.  
27 Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced  
28 approaches. **Reproductive BioMedicine Online**, vol. 37, no. 3, p. 327–339, 2018.  
29 DOI 10.1016/j.rbmo.2018.05.012. Available at:  
30 <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>.
- 31 HOLDEN, S. A.; FERNANDEZ-FUERTE, B.; MURPHY, C.; WHELAN, H.;  
32 O'GORMAN, A.; BRENNAN, L.; BUTLER, S. T.; LONERGAN, P.; FAIR, S.  
33 Relationship between in vitro sperm functional assessments, seminal plasma  
34 composition, and field fertility after AI with either non-sorted or sex-sorted bull semen.  
35 **Theriogenology**, vol. 87, p. 221–228, 2017. DOI  
36 10.1016/j.theriogenology.2016.08.024. Available at:  
37 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.024>.
- 38 HOLT, William V.; CUMMINS, James M.; SOLER, Carles. Computer-assisted sperm  
39 analysis and reproductive science; A gift for understanding gamete biology from  
40 multidisciplinary perspectives. **Reproduction, Fertility and Development**, vol. 30, no.  
41 6, p. iii–v, 2018. <https://doi.org/10.1071/RDv30n6-FO>.
- 42 INANÇ, Muhammed Enes; ÇİL, Beste; TEKIN, Koray; ALEMDAR, Havva; DAŞKIN,

- 1 Ali. The combination of CASA kinetic parameters and fluorescein staining as a fertility  
2 tool in cryopreserved bull semen. **Turkish Journal of Veterinary and Animal**  
3 **Sciences**, vol. 42, no. 5, p. 452–458, 2018. <https://doi.org/10.3906/vet-1801-83>.
- 4 ISACHENKO, Eugenia; ISACHENKO, Vladimir; KATKOV, Igor I.; DESSOLE,  
5 Salvatore; NAWROTH, Frank. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence  
6 of cryoprotectants: From past practical difficulties to present success. **Reproductive**  
7 **BioMedicine Online**, vol. 6, no. 2, p. 191–200, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1472-](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61710-5)  
8 [6483\(10\)61710-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61710-5).
- 9 JOHNSON, L. A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: The state-of-  
10 the-art. **Animal Reproduction Science**, vol. 60–61, p. 93–107, 2000.  
11 [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00088-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00088-9).
- 12 JOHNSON, Linda R.; FOSTER, James A.; HAIG-LADEWIG, Lisa; VANSCOY, Heidi;  
13 RUBIN, Charles S.; MOSS, Stuart B.; GERTON, George L. Assembly of AKAP82, a  
14 protein kinase a anchor protein, into the fibrous sheath of mouse sperm.  
15 **Developmental Biology**, vol. 192, no. 2, p. 340–350, 1997.  
16 <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8767>.
- 17 JUMEAU, F.; SIGALA, J.; DOSSOU-GBETE, F.; FRIMAT, K.; BARBOTIN, A. L.;  
18 BUÉE, L.; BÉHAL, H.; SERGEANT, N.; MITCHELL, V. A-kinase anchor protein 4  
19 precursor (pro-AKAP4) in human spermatozoa. **Andrology**, vol. 6, no. 6, p. 854–859,  
20 2018. <https://doi.org/10.1111/andr.12524>.
- 21 KAJAYSRI, Jatuporn; WATTANANORASATE, Anuwat. Influence of heat stress on  
22 pregnancy rate of beef cattle heifers and cows using ovsynch plus CIDR followed by  
23 timed artificial insemination in Thailand. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, vol.  
24 48, no. 1, p. 71–77, 2018. .
- 25 KANNO, Chihiro; KANG, Sung Sik; KITADE, Yasuyuki; YANAGAWA, Yojiro;  
26 TAKAHASHI, Yoshiyuki; NAGANO, Masashi. Simultaneous evaluation of plasma  
27 membrane integrity, acrosomal integrity, and mitochondrial membrane potential in  
28 bovine spermatozoa by flow cytometry. **Zygote**, vol. 24, no. 4, p. 529–536, 2016.  
29 <https://doi.org/10.1017/S0967199415000490>.
- 30 KASIMANICKAM, R. K.; KASIMANICKAM, V. R.; ARANGASAMY, A.; KASTELIC, J.  
31 P. Sperm and seminal plasma proteomics of high- versus low-fertility Holstein bulls.  
32 **Theriogenology**, vol. 126, p. 41–48, 2019. DOI  
33 10.1016/j.theriogenology.2018.11.032. Available at:  
34 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.032>.
- 35 KASIMANICKAM, Ramanathan; KASIMANICKAM, Vanmathy; RATZBURG, Kamron.  
36 Pregnancy and offspring sex ratio following insemination with SexedULTRA and  
37 conventional semen in cows in a commercial beef operation. **Reproduction in**  
38 **Domestic Animals**, no. July, p. 1–11, 2021. <https://doi.org/10.1111/rda.14008>.
- 39 KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding Soundness Evaluation and Semen  
40 Analysis for Predicting Bull Fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 43, no.  
41 SUPPL.2, p. 368–373, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01186.x>.
- 42 KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; KARTHIKEYA, G.; RENGARAJAN, K.;

- 1 KADIRVEL, G. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using  
2 Computer-Aided System - A Review. **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 46,  
3 no. 1, p. 165–172, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x>.
- 4 KAYA, Abdullah; BIRLER, Sema; ENWALL, Lefric; MEMILI, Erdogan. Determinants of  
5 Sperm Morphology. **Animal Andrology: Theories and Applications**. [S. l.: s. n.],  
6 2014. p. 34–56.
- 7 KAYA, Abdullah; DOGAN, Sule; VARGOVIC, Peter; KUTCHY, Naseer Ahmad; ROSS,  
8 Pablo; TOPPER, Einko; OKO, Richard; VAN DER HOORN, Frans; SUTOVSKY, Peter;  
9 MEMILI, Erdogan. Sperm proteins ODF2 and PAWP as markers of fertility in breeding  
10 bulls. **Cell and Tissue Research**, no. 0123456789, 2021. DOI 10.1007/s00441-021-  
11 03529-1. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03529-1>.
- 12 KAYA, Abdullah; MEMILI, Erdoğan. Sperm macromolecules associated with bull  
13 fertility. **Animal Reproduction Science**, vol. 169, p. 88–94, 2016.  
14 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.015>.
- 15 KHALIL, Wael A.; EL-HARAIRY, Mostafa A.; ZEIDAN, Alaa E.B.; HASSAN, Mahmoud  
16 A.E. Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after  
17 cryopreservation. **Theriogenology**, vol. 126, p. 121–127, 2019.  
18 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.017>.
- 19 KHALIL, Wael A.; EL-HARAIRY, Mostafa A.; ZEIDAN, Alaa E.B.; HASSAN, Mahmoud  
20 A.E.; MOHEY-ELSAEED, Omnia. Evaluation of bull spermatozoa during and after  
21 cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. **International Journal of**  
22 **Veterinary Science and Medicine**, vol. 6, p. S49–S56, 2018. DOI  
23 10.1016/j.ijvsm.2017.11.001. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.11.001>.
- 24 KOWALCZYK, Alicja; KUCZAJ, Marian; CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, Ewa. The  
25 role of environmental optimization for storing bulls' sperm cells. **Systems Biology in**  
26 **Reproductive Medicine**, vol. 66, no. 5, p. 300–310, 2020. DOI  
27 10.1080/19396368.2020.1795432. Available at:  
28 <https://doi.org/10.1080/19396368.2020.1795432>.
- 29 KUMAR, S.; MILLAR, J. D.; WATSON, P. F. The effect of cooling rate on the survival  
30 of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: A comparison of two controlled-  
31 rate cooling machines. **Cryobiology**, vol. 46, no. 3, p. 246–253, 2003.  
32 [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00040-3).
- 33 KUSTER, C. E.; ALTHOUSE, G. C. The impact of bacteriospermia on boar sperm  
34 storage and reproductive performance. **Theriogenology**, vol. 85, no. 1, p. 21–26,  
35 2016. DOI 10.1016/j.theriogenology.2015.09.049. Available at:  
36 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.049>.
- 37 LAMMERS, J.; SPLINGART, C.; BARRIÈRE, P.; JEAN, M.; FRÉOUR, T. Double-blind  
38 prospective study comparing two automated sperm analyzers versus manual semen  
39 assessment. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, vol. 31, no. 1, p. 35–  
40 43, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0139-2>.
- 41 LANGLADE, Camille; BUFF, Samuel; DIAS, Catia; COMMIN, Loris. Assessment of  
42 Optimized Frozen/Thawed Semen Samples in Canines with the New A-Kinase Anchor

- 1 Protein 4 Precursor Biomarker. **Biopreservation and Biobanking**, vol. 18, no. 5, p.  
2 409–414, 2020. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0019>.
- 3 LEITE, Patrícia a.; SHREDER, G. g.; ALMEIDA, Camila l. r.; ZÚCCARI, C. e. s. n;  
4 SILVA, c. e. v. Criopreservação do Sêmen Bovino Bovine Semen Cryopreservation. ,  
5 p. 279–286, 2011. .
- 6 LEITE, Roberta Ferreira; DE AGOSTINI LOSANO, João Diego; DE SOUZA RAMOS  
7 ANGRIMANI, Daniel; SOUSA, Raphaela Gabrielle Brito; DE MIRANDA ALVES,  
8 Álvaro; CAVALLIN, Mônica Degraf; KAWAI, Giulia Kiyomi Vechiato; CORTADA,  
9 Carmen Neusa Martins; ZUGE, Roberta Mara; NICHI, Marcilio. Reproductive  
10 parameters of Bos taurus and Bos indicus bulls during different seasons in tropical  
11 conditions: focus on an alternative approach to testicular assessments using  
12 ultrasonography. **Animal Reproduction Science**, vol. 225, no. May 2020, p. 1–11,  
13 2021. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106668>.
- 14 LEMMA, Alemayehu. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility.  
15 **Artificial Insemination in Farm Animals**, 2011. <https://doi.org/10.5772/16563>.
- 16 LÓPEZ-GATIUS, F. Factors of a noninfectious nature affecting fertility after artificial  
17 insemination in lactating dairy cows. A review. **Theriogenology**, vol. 77, no. 6, p.  
18 1029–1041, 2012. DOI 10.1016/j.theriogenology.2011.10.014. Available at:  
19 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.014>.
- 20 LU, J. C.; HUANG, Y. F.; LÜ, N. Q. Computer-aided sperm analysis: Past, present and  
21 future. **Andrologia**, vol. 46, no. 4, p. 329–338, 2014.  
22 <https://doi.org/10.1111/and.12093>.
- 23 LUCONI, Michaela; CANTINI, Giulia; BALDI, Elisabetta; FORTI, Gianni. Role of a-  
24 kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. **Frontiers in Bioscience**, vol. 16,  
25 no. 4, p. 1315–1330, 2011. <https://doi.org/10.2741/3791>.
- 26 LUCY, M. C.; MCDUGALL, S.; NATION, D. P. The use of hormonal treatments to  
27 improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-  
28 based management systems. **Animal Reproduction Science**, vol. 82–83, p. 495–  
29 512, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.004>.
- 30 MALO, Clara; CARRACEDO, Sara; DELEHEDDE, Maryse; SERGEANT, Nicolas;  
31 SKIDMORE, Julian Alexandra. Identification of proAKAP4 concentration variations in  
32 dromedary sperm and their correlation with monthly semen parameters.  
33 **Reproduction and Fertility**, vol. 2, no. 4, p. 268–279, 2021.  
34 <https://doi.org/10.1530/raf-21-0055>.
- 35 MARQUES, Márcio de Oliveira; MOROTTI, Fábio; LORENZETTI, Elis; BIZARRO-  
36 SILVA, Camila; SENEDA, Marcelo Marcondes. Intensified use of TAI and sexed  
37 semen on commercial farms. **Animal Reproduction**, vol. 15, no. 3, p. 197–203, 2018.  
38 <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0070>.
- 39 MEMILI, Erdogan; FEUGANG, Jean M; BURGESS, Shane C; PEDDINTI,  
40 Divyaswetha; KAYA, Abdullah; NANDURI, Bindu. Comprehensive proteomic analysis  
41 of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers  
42 associated with fertility. **BMC Systems Biology**, vol. 2, no. 1, p. 19, 2008.

- 1 <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-19>.
- 2 MERYMAN, H. T.; WILLIAMS, R. J.; DOUGLAS, M. St J. Freezing injury from “solution  
3 effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection. **Cryobiology**, vol. 14,  
4 no. 3, p. 287–302, 1977. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90177-8](https://doi.org/10.1016/0011-2240(77)90177-8).
- 5 MIKI, Kiyoshi; WILLIS, William D; BROWN, Paula R; GOULDING, Eugenia H;  
6 FULCHER, Kerry D; EDDY, Edward M. Capítulo VIII. La traducción y la intertextualidad  
7 en una fuente documental. vol. 342, p. 331–342, 2002. <https://doi.org/10.1006/d>.
- 8 MIKKOLA, M.; ANDERSSON, M.; TAPONEN, J. Transfer of cattle embryos produced  
9 with sex-sorted semen results in impaired pregnancy rate and increased male calf  
10 mortality. **Theriogenology**, vol. 84, no. 7, p. 1118–1122, 2015. DOI  
11 10.1016/j.theriogenology.2015.06.012. Available at:  
12 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.012>.
- 13 MORAES, Fábio Lucas Zito; MOROTTI, Fábio; COSTA, Camila Bortoliero;  
14 LUNARDELLI, Paula Alvares; SENEDA, Marcelo Marcondes. Relationships between  
15 antral follicle count, body condition, and pregnancy rates after timed-AI in *Bos indicus*  
16 cattle. **Theriogenology**, vol. 136, p. 10–14, 2019.  
17 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.024>.
- 18 MORETTI, Elena; SCAPIGLIATI, Giacomo; PASCARELLI, Nicola Antonio;  
19 BACCETTI, Baccio; COLLODEL, Giulia. Localization of AKAP4 and tubulin proteins in  
20 sperm with reduced motility. **Asian Journal of Andrology**, vol. 9, no. 5, p. 641–649,  
21 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00267.x>.
- 22 MOROTTI, Fábio; DE CAMPOS, Jefferson Tadeu; LUNARDELLI, Paula Alvares;  
23 COSTA, Camila Bortoliero; BERGAMO, Larissa Zamparone; RIGO BARREIROS,  
24 Thales Ricardo; DOS SANTOS, Gustavo Martins Gomes; SENEDA, Marcelo  
25 Marcondes. Injectable progesterone in timed artificial insemination programs in beef  
26 cows. **Animal Reproduction**, vol. 15, no. 1, p. 17–22, 2018.  
27 <https://doi.org/10.21451/1984-3143-2017-AR928>.
- 28 MORRELL, Jane M. Heat stress and bull fertility. **Theriogenology**, vol. 153, no. 2020,  
29 p. 62–67, 2020. DOI 10.1016/j.theriogenology.2020.05.014. Available at:  
30 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.014>.
- 31 MORUZZI, J. F. Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-  
32 chromosome-bearing spermatozoa. **Journal of reproduction and fertility**, vol. 57,  
33 no. 2, p. 319–323, 1979. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0570319>.
- 34 MOSTEK, Agnieszka; JANTA, Anna; CIERESZKO, Andrzej. Proteomic comparison of  
35 non-sexed and sexed (X-bearing) cryopreserved bull semen. **Animal Reproduction  
36 Science**, vol. 221, no. February, p. 106552, 2020. DOI  
37 10.1016/j.anireprosci.2020.106552. Available at:  
38 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106552>.
- 39 MOURA, Arlindo A.; CHAPMAN, David A.; KOC, Hasan; KILLIAN, Gary J. A  
40 comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature  
41 Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, vol. 98, no. 3–4, p. 169–188, 2007.  
42 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.012>.

- 1 MOUSAVI, Seyyed Mojtaba; TOWHIDI, Armin; ZHANDI, Mahdi; AMOABEDINY,  
2 Ghasem; MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, Abdollah; SHARAFI, Mohsen;  
3 HUSSAINI, Sayyed Mohammad Hadi. Comparison of two different antioxidants in a  
4 nano lecithin-based extender for bull sperm cryopreservation. **Animal Reproduction  
5 Science**, vol. 209, no. December 2018, 2019.  
6 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106171>.
- 7 MUHAMMAD ASLAM, M. K.; SHARMA, Vinay K.; PANDEY, Shashank;  
8 KUMARESAN, A.; SRINIVASAN, A.; DATTA, T. K.; MOHANTY, T. K.; YADAV, Savita.  
9 Identification of biomarker candidates for fertility in spermatozoa of crossbred bulls  
10 through comparative proteomics. **Theriogenology**, vol. 119, p. 43–51, 2018. DOI  
11 10.1016/j.theriogenology.2018.06.021. Available at:  
12 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.021>.
- 13 MUREKEZI, Tiba; HIRWA, Claire D'Andre; KANYANDEKWE, Christine; INGABIRE,  
14 Claire; MANZI, Maximillian; KUGONZA, Donald Rugira; NYABINWA, Pascal;  
15 NSHIMIYIMANA, Alphonse Marie; NIYIRAGIRA, Vincent; MYAMBI, Celestin;  
16 AMAHORO, Elyse; GAHAKWA, Daphrose. Influence of breed, season and age on  
17 quality bovine semen used for artificial insemination. **International Journal of  
18 Livestock Production**, vol. 8, no. 6, p. 72–78, 2017.  
19 <https://doi.org/10.5897/ijlp2017.0368>.
- 20 NAGY, Ádám; GÁSPÁRDY, András; SOLTÍ, László; POLICHRONOPOULOS, Tassos;  
21 CSEH, Sándor. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters  
22 generated by computer-assisted semen analysis. **Acta Veterinaria Hungarica**, vol.  
23 63, no. 3, p. 370–381, 2015. <https://doi.org/10.1556/004.2015.035>.
- 24 NEGREIROS, Maria Paula Marinho; SEUGLING, Guilherme Henrique Freitas;  
25 ALMEIDA, Ana Beatriz Marques; HIDALGO, Myrian Megumy Tsunokawa; MARTINS,  
26 Maria Isabel Mello; BLASCHI, Wanessa; BARREIROS, Thales Ricardo Rigo. Influence  
27 of nutritional and ovarian parameters on pregnancy rates of Nelore cows artificially  
28 inseminated at fixed time. **Research, Society and Development**, vol. 9, no. 9, p. 1–  
29 18, 2020. Available at: <http://www.elsevier.com/locate/scp>.
- 30 OLIVA, Rafael; DE MATEO, Sara; ESTANYOL, Josep Maria. Sperm cell proteomics.  
31 **Proteomics**, vol. 9, no. 4, p. 1004–1017, 2009.  
32 <https://doi.org/10.1002/pmic.200800588>.
- 33 OLIVEIRA, Letícia Zoccolaro; ARRUDA, Rubens Paes de; ANDRADE, André Furugen  
34 Cesar de; CELEGHINI, Eneiva Carla Carvalho; REEB, Pablo Daniel; MARTINS, João  
35 Paulo Nascimento; SANTOS, Ricarda Maria dos; BELETTI, Marcelo Emílio; PERES,  
36 Rogério Fonseca Guimarães; MONTEIRO, Fabio Morato; HOSSEPIAN DE LIMA,  
37 Vera Fernanda Martins. Assessment of in vitro sperm characteristics and their  
38 importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal  
39 Reproduction Science**, vol. 137, no. 3–4, p. 145–155, 2013. DOI  
40 10.1016/j.anireprosci.2013.01.010. Available at:  
41 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.01.010>.
- 42 PEIPPO, J.; VARTIA, K.; KANANEN-ANTTILA, K.; RÄTY, M.; KORHONEN, K.;  
43 HURME, T.; MYLLYMÄKI, H.; SAIRANEN, A.; MÄKI-TANILA, A. Embryo production  
44 from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with

- 1 frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. **Animal Reproduction**  
2 **Science**, vol. 111, no. 1, p. 80–92, 2009.  
3 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.02.002>.
- 4 PELLEGRINO, C. A.G.; MOROTTI, F.; UNTURA, R. M.; PONTES, J. H.F.;  
5 PELLEGRINO, M. F.O.; CAMPOLINA, J. P.; SENEDA, M. M.; BARBOSA, F. A.;  
6 HENRY, M. Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-  
7 time embryo transfer of in vitro–produced embryos in cattle. **Theriogenology**, vol. 86,  
8 no. 3, p. 888–893, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.010>.
- 9 PEÑA, Fernando J.; ORTEGA FERRUSOLA, Cristina; MARTÍN MUÑOZ, Patricia.  
10 New flow cytometry approaches in equine andrology. **Theriogenology**, vol. 86, no. 1,  
11 p. 366–372, 2016. DOI 10.1016/j.theriogenology.2016.04.050. Available at:  
12 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.050>.
- 13 PEREIRA, L. L.; FERREIRA, A. P.; VALE, W. G.; SERIQUE, L. R.; NEVES, K. A.L.;  
14 MORINI, A. C.; MONTEIRO, B. M.; MINERVINO, A. H.H. Effect of body condition score  
15 and reuse of progesterone-releasing intravaginal devices on conception rate following  
16 timed artificial insemination in Nelore cows. **Reproduction in Domestic Animals**, vol.  
17 53, no. 3, p. 624–628, 2018. <https://doi.org/10.1111/rda.13150>.
- 18 PERIS-FRAU, Patricia; SOLER, Ana Josefa; INIESTA-CUERDA, María; MARTÍN-  
19 MAESTRO, Alicia; SÁNCHEZ-AJOFRÍN, Irene; MEDINA-CHÁVEZ, Daniela  
20 Alejandra; FERNÁNDEZ-SANTOS, María Rocío; GARCÍA-ÁLVAREZ, Olga;  
21 MAROTO-MORALES, Alejandro; MONTORO, Vidal; GARDE, J. Julián. Sperm  
22 cryodamage in ruminants: Understanding the molecular changes induced by the  
23 cryopreservation process to optimize sperm quality. **International Journal of**  
24 **Molecular Sciences**, vol. 21, no. 8, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21082781>.
- 25 PFEIFER, Luiz Francisco Machado; RODRIGUES, Walvonvitis Baes; NOGUEIRA,  
26 Eriklis. Relationship between body condition score index and fertility in beef cows  
27 subjected to timed artificial insemination. **Livestock Science**, vol. 248, no. March,  
28 2021. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104482>.
- 29 POLGE, C. Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. **Proceedings of**  
30 **the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological**  
31 **character. Royal Society (Great Britain)**, vol. 147, no. 929, p. 498–508, 1957.  
32 <https://doi.org/10.1098/rspb.1957.0068>.
- 33 RAHAMIM BEN-NAVI, Liat; ALMOG, Tal; YAO, Zhong; SEGER, Rony; NAOR, Zvi. A-  
34 Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) is an ERK1/2 substrate and a switch molecule  
35 between cAMP/PKA and PKC/ERK1/2 in human spermatozoa. **Scientific Reports**,  
36 vol. 6, no. November, p. 1–13, 2016. DOI 10.1038/srep37922. Available at:  
37 <http://dx.doi.org/10.1038/srep37922>.
- 38 RAHEJA, Nitin; CHOUDHARY, Sanjay; GREWAL, Sonika; SHARMA, Neha; KUMAR,  
39 Nishant. A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull  
40 semen preservation. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, vol. 6, no. 3, p.  
41 239–245, 2018. .
- 42 RAHMAN, Md Saidur; PANG, Myung Geol. New Biological Insights on X and Y

- 1 Chromosome-Bearing Spermatozoa. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**,  
2 vol. 7, no. January, p. 1–19, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00388>.
- 3 RAWAT, Meenakshi; SHARMA, Mridula. EFFECT OF PERCOLL DENSITY  
4 GRADIENT SEPARATION OF X AND Y SPERM ON EFFECT OF PERCOLL  
5 DENSITY GRADIENT SEPARATION OF X AND Y SPERM ON BUFFALO BULL  
6 SEMEN QUALITY. **Journal of Experimental Zoology**, vol. 23, no. February, 2021. .
- 7 REESE, S. T.; FRANCO, G. A.; POOLE, R. K.; HOOD, R.; FERNADEZ MONTERO,  
8 L.; OLIVEIRA FILHO, R. V.; COOKE, R. F.; POHLER, K. G. Pregnancy loss in beef  
9 cattle: A meta-analysis. **Animal Reproduction Science**, vol. 212, p. 106251, 2020.  
10 DOI 10.1016/j.anireprosci.2019.106251. Available at:  
11 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106251>.
- 12 REESE, Sven; PIREZ, Miguel Camara; STEELE, Heather; KÖLLE, Sabine. The  
13 reproductive success of bovine sperm after sex-sorting: a meta-analysis. **Scientific**  
14 **Reports**, vol. 11, no. 1, p. 1–18, 2021. DOI 10.1038/s41598-021-96834-2. Available  
15 at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96834-2>.
- 16 REGO, J. P.A.; CRISP, J. M.; MOURA, A. A.; NOUWENS, A. S.; LI, Y.; VENUS, B.;  
17 CORBET, N. J.; CORBET, D. H.; BURNS, B. M.; BOE-HANSEN, G. B.; MCGOWAN,  
18 M. R. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. **Animal**  
19 **Reproduction Science**, vol. 148, no. 1–2, p. 1–17, 2014.  
20 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.04.016>.
- 21 REGO, J. P.A.; MARTINS, J. M.; WOLF, C. A.; VAN TILBURG, M.; MORENO, F.;  
22 MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; SANTOS, D. O.; MOURA, A. A.  
23 Proteomic analysis of seminal plasma and sperm cells and their associations with  
24 semen freezability in Guzerat bulls. **Journal of Animal Science**, vol. 94, no. 12, p.  
25 5308–5320, 2016. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0811>.
- 26 RIESCO, Marta F.; ANEL-LOPEZ, Luis; NEILA-MONTERO, Marta; PALACIN-  
27 MARTINEZ, Cristina; MONTES-GARRIDO, Rafael; ALVAREZ, Mercedes; DE PAZ,  
28 Paulino; ANEL, Luis. Proakap4 as novel molecular marker of sperm quality in ram: An  
29 integrative study in fresh, cooled and cryopreserved sperm. **Biomolecules**, vol. 10,  
30 no. 7, p. 1–21, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10071046>.
- 31 RIZZOTO, G.; FERREIRA, J. C.P.; CODOGNOTO, V. M.; OLIVEIRA, K. C.;  
32 MOGOLLÓN GARCÍA, H. D.; PUPULIM, A. G.R.; TEIXEIRA-NETO, F. J.; CASTILHO,  
33 A.; NUNES, S. G.; THUNDATHIL, J. C.; KASTELIC, J. P. Testicular hyperthermia  
34 reduces testosterone concentrations and alters gene expression in testes of Nelore  
35 bulls. **Theriogenology**, vol. 152, p. 64–68, 2020.  
36 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.029>.
- 37 ROMANELLO, Narian; DE BRITO LOURENÇO JUNIOR, José; BARIONI JUNIOR,  
38 Waldomiro; BRANDÃO, Felipe Zandonadi; MARCONDES, Cintia Righetti;  
39 PEZZOPANE, José Ricardo Macedo; DE ANDRADE PANTOJA, Messy Hannear;  
40 BOTTA, Daniela; GIRO, Alessandro; MOURA, Ana Beatriz Bossois; DO  
41 NASCIMENTO BARRETO, Andréa; GARCIA, Alexandre Rossetto. Thermoregulatory  
42 responses and reproductive traits in composite beef bulls raised in a tropical climate.  
43 **International Journal of Biometeorology**, vol. 62, no. 9, p. 1575–1586, 2018.

- 1 <https://doi.org/10.1007/s00484-018-1557-8>.
- 2 ROYERE, D.; BARTHELEMY, C.; HAMAMAH, S.; LANSAC, J. Cryopreservation of  
3 spermatozoa: A 1996 review. **Human Reproduction Update**, vol. 2, no. 6, p. 553–  
4 559, 1996. <https://doi.org/10.1093/humupd/2.6.553>.
- 5 RUELLE, I.; SEREGEANT, N.; BENCHARIF, D.; CHARREAUX, F.; THORIN, C.;  
6 MICHAUD, S.; DORDAS-PERPINYÀ, M.; JOUY, N.; AUDRY, S.; MAURAGE, C.;  
7 DELEHEDDE, M.; BRIAND-AMIRAT, L. 145 ProAKAP4 concentrations in semen as a  
8 predictive tool of bull fertility: A preliminary study. **Reproduction, Fertility and**  
9 **Development**, vol. 32, no. 2, p. 199, 2020. <https://doi.org/10.1071/rdv32n2ab145>.
- 10 RUELLE, Isabelle; CHARREAUX, Frédéric; BENCHARIF, Djemil; THORIN, Chantal;  
11 MICHAUD, Sandrine; SCHMITT, Eric; SERGEANT, Nicolas; BRIAND-AMIRAT,  
12 Lamia; DELEHEDDE, Maryse. Assessment of the sperm specific protein proAKAP4  
13 as a marker to evaluate sperm quality and fertility in Holstein bulls. **Revista Brasileira**  
14 **de Reprodução Animal**, vol. 43, no. 2, p. 472, 2019. .
- 15 SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.;  
16 SILVA, R. C.P.; RODRIGUES, C. A.; MADUREIRA, E. H.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P.  
17 S. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance  
18 fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore  
19 (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, vol. 73, no. 5, p. 651–658, 2010. DOI  
20 10.1016/j.theriogenology.2009.11.004. Available at:  
21 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.004>.
- 22 SÁ FILHO, M. F.; GIROTTO, R.; ABE, E. K.; PENTEADO, L.; CAMPOS FILHO, E. P.;  
23 MORENO, J. F.; SALA, R. V.; NICHI, M.; BARUSELLI, P. S. Optimizing the use of sex-  
24 sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. **Journal**  
25 **of Animal Science**, vol. 90, no. 6, p. 1816–1823, 2012.  
26 <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4523>.
- 27 SÁ FILHO, M. F.; NICHI, M.; SOARES, J. G.; VIEIRA, L. M.; MELO, L. F.; OJEDA, A.;  
28 CAMPOS FILHO, E. P.; GAMEIRO, A. H.; SARTORI, R.; BARUSELLI, P. S. Sex-  
29 sorted sperm for artificial insemination and embryo transfer programs in cattle. **Animal**  
30 **Reproduction**, vol. 11, no. 3, p. 217–224, 2014. .
- 31 SÁ FILHO, Manoel F.; PENTEADO, Luciano; REIS, Everton L.; REIS, Tomás  
32 A.N.P.S.; GALVÃO, Klíbs N.; BARUSELLI, Pietro S. Timed artificial insemination early  
33 in the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows.  
34 **Theriogenology**, vol. 79, no. 4, p. 625–632, 2013. DOI  
35 10.1016/j.theriogenology.2012.11.016. Available at:  
36 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.016>.
- 37 SAACKE, R. G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and  
38 un-compensable traits in semen. **Theriogenology**, vol. 70, no. 3, p. 473–478, 2008.  
39 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.012>.
- 40 SAACKE, R. G.; DEJARNETTE, J. M.; BAME, J. H.; KARABINUS, D. S.; WHITMAN,  
41 S. S. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially  
42 inseminated super- and single-ovulating cattle? **Theriogenology**, vol. 50, no. 1, p.

- 1 117–128, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00119-8).
- 2 SALAMON, S.; MAXWELL, W. M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction**  
3 **Science**, vol. 62, no. 1–3, p. 77–111, 2000. <https://doi.org/10.1016/S0378->  
4 4320(00)00155-X.
- 5 SALES, J. N.S.; BOTTINO, M. P.; SILVA, L. A.C.L.; GIROTTO, R. W.; MASSONETO,  
6 J. P.M.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. Effects of eCG are more pronounced in  
7 primiparous than multiparous *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial  
8 insemination protocol. **Theriogenology**, vol. 86, no. 9, p. 2290–2295, 2016.  
9 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.023>.
- 10 SARTORI, R.; PRATA, A. B.; FIGUEIREDO, A. C.S.; SANCHES, B. V.; PONTES, G.  
11 C.S.; VIANA, J. H.M.; PONTES, J. H.; VASCONCELOS, J. L.M.; PEREIRA, M. H.C.;  
12 DODE, M. A.N.; MONTEIRO, P. L.J.; BARUSELLI, P. S. Update and overview on  
13 assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, vol. 13,  
14 no. 3, p. 300–312, 2016. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR873>.
- 15 SCHENK, J L; JR, G E Seidel. DigitalCommons @ University of Nebraska - Lincoln  
16 Imminent Commercialization of Sexed Bovine Sperm. no. December, 1999. .
- 17 SCOTT, Caroline; SOUZA, Fabiana F De; ARISTIZABAL, Viviana H V;  
18 HETHRINGTON, Louise; KRISP, Christoph; MOLLOY, Mark; BAKER, Mark A.  
19 Proteomic profile of sex-sorted bull sperm evaluated by SWATH- MS analysis. vol.  
20 198, no. August, p. 121–128, 2018. .
- 21 SCOTT, Caroline; SOUZA, Fabiana Ferreira; MOTHÉ, Gabriele Barros;  
22 ARISTIZABAL, Viviana Helena Vallejo; JUNIOR, José Antonio Dell'Aqua. Estudo  
23 sobre as diferentes técnicas de sexagem de espermatozoides. **Veterinária e**  
24 **Zootecnia**, vol. 25, no. 1, p. 21–29, 2018. <https://doi.org/10.35172/rvz.2018.v25.25>.
- 25 SEIDEL, G. E. Economics of selecting for sex: The most important genetic trait.  
26 **Theriogenology**, vol. 59, no. 2, p. 585–598, 2003. <https://doi.org/10.1016/S0093->  
27 691X(02)01242-6.
- 28 SEIDEL, G. E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, vol. 68, no. 3, p. 443–446,  
29 2007. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.005>.
- 30 SELLEM, E.; BROEKHUIJSE, M. L.W.J.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT,  
31 E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E. P.C. Use of combinations of in vitro quality  
32 assessments to predict fertility of bovine semen. **Theriogenology**, vol. 84, no. 9, p.  
33 1447-1454.e5, 2015. DOI 10.1016/j.theriogenology.2015.07.035. Available at:  
34 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.035>.
- 35 SERGEANT, Nicolas; BRIAND-AMIRAT, Lamia; BENCHARIF, Djemil; DELEHEDDE,  
36 Maryse. The Sperm Specific Protein Proakap4 as an Innovative Marker to Evaluate  
37 Sperm Quality and Fertility. **Journal of Dairy & Veterinary Sciences**, vol. 11, no. 1,  
38 2019. <https://doi.org/10.19080/jdvs.2019.11.555803>.
- 39 SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a  
40 fertilidade. **A Hora Veterinária**, vol. 28, no. 167, p. 36–39, 2009. .

- 1 SHAHAT, A. M.; RIZZOTO, G.; KASTELIC, J. P. Amelioration of heat stress-induced  
2 damage to testes and sperm quality. **Theriogenology**, vol. 158, p. 84–96, 2020.  
3 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.08.034>.
- 4 SHANGGUAN, Aishao; ZHOU, Hao; SUN, Wei; DING, Rui; LI, Xihe; LIU, Jiajia; ZHOU,  
5 Yang; CHEN, Xing; DING, Fengling; YANG, Liguu; ZHANG, Shujun. Cryopreservation  
6 Induces Alterations of miRNA and mRNA Fragment Profiles of Bull Sperm. **Frontiers**  
7 **in Genetics**, vol. 11, no. May, p. 1–9, 2020. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00419>.
- 8 SIMONIK, O.; SICHTAR, J.; KREJCARKOVA, A.; RAJMON, R.; STADNIK, L.;  
9 BERAN, J.; DOLEZALOVA, M.; BINIOVA, Z. Computer assisted sperm analysis - The  
10 relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: A review.  
11 **Indian Journal of Animal Sciences**, vol. 85, no. 1, p. 3–11, 2015. .
- 12 SINGH, A. K.; KUMAR, A.; BISLA, A. Computer-assisted sperm analysis (CASA) in  
13 veterinary science: A review. **Indian Journal of Animal Sciences**, vol. 91, no. 6, p.  
14 419–429, 2021. .
- 15 SINGH, R.; SENGAR, G. S.; SINGH, U.; DEB, R.; JUNGHARE, V.; HAZRA, S.;  
16 KUMAR, S.; TYAGI, S.; DAS, A. K.; RAJA, T. V.; KUMAR, A. Functional proteomic  
17 analysis of crossbred (Holstein Friesian × Sahiwal) bull spermatozoa. **Reproduction**  
18 **in Domestic Animals**, vol. 53, no. 3, p. 588–608, 2018.  
19 <https://doi.org/10.1111/rda.13146>.
- 20 SMALL, J. A.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of  
21 progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-  
22 AI in beef cattle. **Theriogenology**, vol. 71, no. 4, p. 698–706, 2009.  
23 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.045>.
- 24 SOARES, J. G.; MARTINS, C. M.; CARVALHO, N. A.T.; NICACIO, A. C.; ABREU-  
25 SILVA, A. L.; CAMPOS FILHO, Evanil P.; TORRES JÚNIOR, J. R.S.; SÁ FILHO, M.  
26 F.; BARUSELLI, P. S. Timing of insemination using sex-sorted sperm in embryo  
27 production with *Bos indicus* and *Bos taurus* superovulated donors. **Animal**  
28 **Reproduction Science**, vol. 127, no. 3–4, p. 148–153, 2011. DOI  
29 10.1016/j.anireprosci.2011.08.003. Available at:  
30 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.08.003>.
- 31 SOMASHEKAR, L.; PARTHIPAN, S.; RAVINDRA, J. P.; KARTHIK BHAT, S.;  
32 VENKATASWAMY, M. M.; SELVARAJU, S.; BINSILA, B. K.; PATIL, S. K. Comparative  
33 sperm protein profiling in bulls differing in fertility and identification of  
34 phosphatidylethanolamine-binding protein 4, a potential fertility marker. **Andrology**,  
35 vol. 5, no. 5, p. 1032–1051, 2017. <https://doi.org/10.1111/andr.12404>.
- 36 SUZUKI, Tatsuya; TAKAMIZAWA, Satoru; OBARA, Hiromi; OHNO, Akiko;  
37 SHIBAHARA, Hiroaki; SUZUKI, Mitsuki; HIRANO, Yuki; AYUSTAWATI. Prediction of  
38 pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in  
39 patients with male factor infertility. **International Journal of Andrology**, vol. 27, no.  
40 2, p. 63–68, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0105-6263.2004.00437.x>.
- 41 THOMAS, J. M.; LOCKE, J. W.C.; BONACKER, R. C.; KNICKMEYER, E. R.; WILSON,  
42 D. J.; VISHWANATH, R.; ARNETT, A. M.; SMITH, M. F.; PATTERSON, D. J.

- 1 Evaluation of SexedULTRA 4M™ sex-sorted semen in timed artificial insemination  
2 programs for mature beef cows. **Theriogenology**, vol. 123, p. 100–107, 2019.  
3 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.039>.
- 4 THOMAS, J. M.; LOCKE, J. W.C.; VISHWANATH, R.; HALL, J. B.; ELLERSIECK, M.  
5 R.; SMITH, M. F.; PATTERSON, D. J. Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted  
6 semen for timed artificial insemination of beef heifers. **Theriogenology**, vol. 98, p. 88–  
7 93, 2017. DOI 10.1016/j.theriogenology.2017.03.018. Available at:  
8 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.018>.
- 9 TURNER, Regina M.O.; JOHNSON, Linda R.; HAIG-LADEWIG, Lisa; GERTON,  
10 George L.; MOSS, Stuart B. An X-linked gene encodes a major human sperm fibrous  
11 sheath protein, hAKAP82. Genomic organization, protein kinase A-RII binding, and  
12 distribution of the precursor in the sperm tail. **Journal of Biological Chemistry**, vol.  
13 273, no. 48, p. 32135–32141, 1999. DOI 10.1074/jbc.273.48.32135. Available at:  
14 <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.48.32135>.
- 15 UGUR, Muhammet R.; KUTCHY, Naseer A.; MENEZES, Erika B.; UL-HUSNA, Asma;  
16 HAYNES, Bethany Peyton; UZUN, Alper; KAYA, Abdullah; TOPPER, Einko; MOURA,  
17 Arlindo A.; MEMILI, Erdogan. Retained acetylated histone four in bull sperm  
18 associated with fertility. **Frontiers in Veterinary Science**, vol. 6, no. JUN, p. 1–10,  
19 2019. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00223>.
- 20 UGUR, Muhammet Rasit; SABER ABDELRAHMAN, Amal; EVANS, Holly C.;  
21 GILMORE, Alicia A.; HITIT, Mustafa; ARIFIANTINI, Raden Iis; PURWANTARA,  
22 Bambang; KAYA, Abdullah; MEMILI, Erdogan. Advances in Cryopreservation of Bull  
23 Sperm. **Frontiers in Veterinary Science**, vol. 6, no. August, p. 1–15, 2019.  
24 <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>.
- 25 VIANA, A. G. A.; MARTINS, A. M. A.; PONTES, A. H.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.;  
26 RICART, C. A. O.; SOUSA, M. V.; KAYA, A.; TOPPER, E.; MEMILI, E.; MOURA, A. A.  
27 Proteomic landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility. **Scientific**  
28 **Reports**, vol. 8, no. 1, p. 1–13, 2018. DOI 10.1038/s41598-018-34152-w. Available at:  
29 <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-34152-w>.
- 30 VINCENT, Patrick; UNDERWOOD, Shelley L.; DOLBEC, Catherine; BOUCHARD,  
31 Nadine; KROETSCH, Tom; BLONDIN, Patrick. Bovine Semen Quality Control in  
32 Artificial Insemination Centers. **Bovine Reproduction**, , p. 685–695, 2021.  
33 <https://doi.org/10.1002/9781118833971.ch74>.
- 34 VISHWANATH, R.; MORENO, J. F. Review: Semen sexing - Current state of the art  
35 with emphasis on bovine species. **Animal**, vol. 12, no. s1, p. s85–s96, 2018.  
36 <https://doi.org/10.1017/S1751731118000496>.
- 37 WEBER, James E.; RUSSELL, Lonnie D. A study of intercellular bridges during  
38 spermatogenesis in the rat. **American Journal of Anatomy**, vol. 180, no. 1, p. 1–24,  
39 1987. <https://doi.org/10.1002/aja.1001800102>.
- 40 WOODS, Erik; THIRUMALA, Sreedhar; HAN, Xu; CRITSER, John K. Reproductive  
41 biology and cryobiology Chapter. **Fundamental cryobiology of reproductive cells**  
42 **and tissues**, no. 1, p. 129–144, 2011. .

- 1 YÁNIZ, J. L.; SILVESTRE, M. A.; SANTOLARIA, P.; SOLER, C. CASA-Mot in  
2 mammals: An update. **Reproduction, Fertility and Development**, vol. 30, no. 6, p.  
3 799–809, 2018. <https://doi.org/10.1071/RD17432>.
- 4 ZHANG, X. G.; HONG, J. Y.; YAN, G. J.; WANG, Y. F.; LI, Q. W.; HU, J. H. Association  
5 of heat shock protein 70 with motility of frozen-thawed sperm in bulls. **Czech Journal**  
6 **of Animal Science**, vol. 60, no. 6, p. 256–262, 2015. <https://doi.org/10.17221/8239->  
7 CJAS.
- 8 ZOCA, Gabriela Bertaiolli; CELEGHINI, Eneiva Carla Carvalho; PUGLIESI, Guilherme;  
9 DE CARVALHO, Carla Patricia Teodoro; ASSUMPÇÃO, Mayra Elena Ortiz D.Avila;  
10 SIQUEIRA, Adriano Felipe Perez; OLIVEIRA, Leticia Zoccolaro; LANÇONI, Renata;  
11 DE ARRUDA, Rubens Paes. Influence of seminal plasma during different stages of  
12 bovine sperm cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 56, no. 6,  
13 p. 872–883, 2021. <https://doi.org/10.1111/rda.13928>.

#### 1 4 HIPÓTESE

- 2 A concentração de proAKAP4 permite a seleção de touros de alta fertilidade,
- 3 pois apresenta relação com a cinética de espermatozoides convencionais e
- 4 sexados de touros *Bos indicus*, além de correlacionar positivamente com as
- 5 taxas de prenhez obtidas pela Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).

## 1 5 OBJETIVOS

### 2 5.1 OBJETIVO GERAL

3 Avaliar as concentrações de proAKAP4 em sêmen convencional e sexado de  
4 touros *Bos indicus*, e correlacionar este polipeptídio às análises espermáticas  
5 *in vitro* e com taxas de prenhez obtidas na IATF.

### 6 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 7 1- Quantificar e comparar as concentrações de proAKAP4 em espermatozoides que  
8 compõe doses de sêmen bovino criopreservadas, sendo sexadas e convencionais;
- 9 2- Correlacionar as concentrações de proAKAP4 às características cinéticas,  
10 morfológicas e morfofuncionais do sêmen bovino avaliado;
- 11 3- Correlacionar as concentrações de proAKAP4 do sêmen convencional às taxas de  
12 concepção à IATF.

1 **6 ARTIGO 1** – O manuscrito a seguir foi redigido de acordo com as normas do  
2 periódico científico Theriogenology. As normas estão disponíveis no link:  
3 <https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>

4 **The proAKAP4 use as a biomarker for the *Bos indicus* bulls X-sorted sperm**  
5 **quality**

6 Ana Beatriz Marques de Almeida<sup>1</sup>; Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo<sup>1</sup>; Luiz  
7 Guilherme Corsi Trautwein<sup>1</sup>; Josiana de Fátima Schnitzer<sup>1</sup>; Letícia Amanda dos  
8 Santos Silva<sup>1</sup>; Fábio Lucas Zito de Moraes<sup>2</sup>; João Carlos Pinheiro Ferreira<sup>3</sup>; Maria  
9 Isabel Mello Martins<sup>4\*</sup>

10 <sup>1</sup> LARAA – Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida da Universidade  
11 Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná-Brazil.

12 <sup>2</sup> Self-employed Veterinarian, Londrina, Paraná-Brazil.

13 <sup>3</sup> Professor at the Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction – School of  
14 Veterinary Medicine and Animal Science of the Sao Paulo State University – UNESP,  
15 Botucatu, São Paulo – Brazil.

16 <sup>1,4</sup> Professor at the Department of Animal Clinics of the Universidade Estadual de Londrina –  
17 UEL, Londrina, Paraná-Brazil.

18 \*Correspondence: [imartins@uel.br](mailto:imartins@uel.br)

19 **Abstract:** The ProAKAP4 is a protein precursor present in the spermatid flagellum,  
20 associated with sperm motility, and which has been evaluated in several species, but  
21 its concentration, as we know, has never been measured in sex-sorted sperm. Thus,  
22 the study aimed to test the proAKAP4 as a suitable sperm quality biomarker for X  
23 sorted sperm from *Bos indicus* bulls. It was evaluated 14 semen straws from different  
24 bulls, six of X sorted sperm and eight doses of conventional semen. Sperm kinetics  
25 and morphofunctional evaluation was carried out, in addition to the concentration of  
26 proAKAP4. The parameters evaluated were compared by the Students' T-test and  
27 correlated by the Pearson product correlation. A significant difference was found for  
28 total motility (P = 0.014), fast sperm (P = 0.020) and sperm area (P = 0.013) between  
29 the conventional and X-sorted sperm. The proAKAP4 concentration was higher in the  
30 X-sorted sperm (X-sorted sperm: 67.54 ng/10<sup>6</sup> spermatozoa; conventional sperm:  
31 29.76 ng/10<sup>6</sup> spermatozoa), but it did not correlate to none of the kinetics or  
32 morphofunctional parameters evaluated. However, the proAKAP4 in conventional  
33 sperm showed relation to sperm total and progressive motility, fast sperm and sperm  
34 membrane integrity. The study concluded that the proAKAP4 is not a valid biomarker  
35 to indicate sperm quality in the X sorted sperm.

36 **Keywords:** AKAP4 protein; conventional sperm; sex-sorted sperm; X chromosome.

## 1 1. Introduction

2 The use of sex sorted sperm gained ground in reproductive biotechnologies by  
3 accelerating genetic progress and by generating calves of the sex desired by the cattle  
4 breeder [1,2]. In recent years, through improvements to the sexing technique, the sex-  
5 sorted semen has become as viable as the conventional sperm in bovine reproduction  
6 [2,3]. However, to guarantee the effectiveness of using sex-sorted or conventional  
7 sperm, seminal quality evaluations are essential to infer the probability of reproductive  
8 success of their use.

9 Although the analysis of sperm quality parameters be essential for the  
10 commercialization of cryopreserved sperm, these methods are not always sufficient to  
11 predict fertility rates in the field [4,5]. For this reason, researchers have been looking  
12 for protein biomarkers that can select fertile bulls with greater accuracy [5].

13 A highlighted protein that has been studied for its potential as a biomarker is the  
14 AKAP4 (A-kinase anchor protein 4) and the proAKAP4 (AKAP4 precursor). The  
15 proAKAP4 transcripts, encoded by an X-chromosome gene, are observed in post-  
16 meiosis spermatids [6,7]. Because the spermatozoa are a transcriptionally inactive cell,  
17 the proAKAP4 is a storage of the AKAP4, even so, only the AKAP4 has an active  
18 potential. Additionally, the AKAP4 concentration is modulated according to the  
19 proAKAP4 stock [5].

20 The AKAP4 is the major sperm fibrous sheath protein [8,9]. Due to its structural  
21 function, both the AKAP4 and proAKAP4 assist in the physiology of sperm motility,  
22 since the AKAP4 protein tether the sperm flagellum enzymes closer to their respective  
23 substrates, which induces the phosphorylation of cAMP-dependent proteins, resulting  
24 in sperm motility [5,6].

25 The proAKAP4 molecule is extremely conserved in mammalian spermatozoa  
26 [5]. And so, the concentration of proAKAP4 has been considered an indicator of sperm  
27 quality and fertility in man [9], stallion [8], ram [10], and bull sperm [11,12]; however,  
28 its level has not been determined in X-sorted sperm of any species yet. Furthermore,  
29 there are no records of its concentration in *Bos indicus* bulls.

30 As an X-chromosome gene encodes the proAKAP4 protein, we hypothesized  
31 that its level would be higher in X-sorted semen than in conventional ones. Therefore,  
32 our objectives were to characterize the concentration of proAKAP4 in *Bos indicus* X-  
33 sorted sperm and its relationship with the sperm kinetics parameters.

## 1 2. Materials and Methods

2 The present study was approved by the Universidade Estadual de Londrina  
3 Ethics Committee on the Use of Animals - CEUA / UEL number 22460.2018.26.

### 4 2.1 Sperm samples

5 Fourteen commercial cryopreserved *Bos indicus* 250µL sperm straws (Nelore:  
6 11 and Gir: 3) from different bulls were used. Six straws contained  $2 \times 10^6$  X-sorted  
7 sperm (Nelore: 3 and Gir: 3), and eight straws were composed by conventional sperm  
8 (Nelore: 8).

### 9 2.2 Sperm analysis

10 The sperm straws were thawed in water bath at 37°C for 30 sec, packed into  
11 microtubes incubated at 37°C for 3 minutes before analysis.

12 For the sperm kinetics analysis, a 3 µL sperm sample were placed in a  
13 preheated Cell-Vu® Sperm counting chamber (Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA)  
14 and covered by a coverslip.

15 The sperm kinetics evaluation was performed by the Computer Assisted Sperm  
16 Analysis (CASA- Hamilton-Thorne IVOS, Beverly, MA, USA, version 14.0), adjusted  
17 for the bovine sperm (setup parameters-values: Frames Acquired: 30; Frame Rate: 60  
18 Hz; Minimum Cell Size: 5 pixels; Minimum Static Contrast: 30; Straightness (STR)  
19 Threshold: 70%; VAP cut-off: 30 µm/s; Prog. Min VAP: 50 µm/s; VSL cut-off: 15 µm/s.  
20 The CASA parameters evaluated included: Total Motility (% TM); Progressive Motility  
21 (% PM); Fast Sperm (% Rapid); Static Sperm (% Static), Travel Speed (µm/s VAP);  
22 Progressive Speed (µm/s VSL); Curvilinear Speed (µm/s VCL); Lateral Head  
23 Amplitude (µm ALH); Straightness (% STR); Linearity (% LIN); Elongation (% ELONG);  
24 Area (µm<sup>2</sup> Area).

25 For the morpho-functional analysis, 100 µL of each sperm sample were diluted  
26 in TALP medium to achieve the  $5 \times 10^6$  spermatozoa/mL; then, the volume was divided  
27 into two microtubes to add the fluorescent probes and incubated in water bath at 37°C.  
28 In the first microtube, 20 µM of the MitoTracker Red CMXRos (M-7512; Molecular  
29 Probes, Eugene, OR) was added to evaluate sperm mitochondrial activity (MITO %),  
30 following the manufacturer's instructions. In the second microtube, 15 µM of Propidium  
31 Iodide (0.5 m/mL, L0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA) were added  
32 to measure the sperm membrane integrity (PI %). Both analyses were conducted in

1 the BD Accuri C6™ flow cytometer (Beckton-Dickeson, San Jose, USA), equipped with  
2 an argon laser (488nm pass) and a red laser (640nm range), which affected the  
3 fluorescence emission of 10,000 spermatozoa.

#### 4 *2.3 ProAKAP4 sperm concentration*

5 Following the manufacturer's instructions, a commercial ELISA kit was used to  
6 quantify the proAKAP4 sperm concentration (4BioDx, 4VDX-18K3, France).

7 Briefly, 50 µL of frozen-thawed sperm was lysed and added to each well of the  
8 microplate containing the proAKP4 antibody. Next, the microplate was incubated for 2  
9 h at room temperature (24°C). Then, sequentially, the wells were washed to remove  
10 the lysis buffer, the detection antibody was added, and the microplate was again  
11 incubated at room temperature for 1 hour. After that, the wells were rewashed, the  
12 substrate solution was added, and a new incubation was performed for 10 min. Finally,  
13 the stop solution was added to each well, and the optical density was measured at 450  
14 nm in an ELISA microplate reader.

15 The proAKAP4 concentration is expressed as ng/10<sup>6</sup> spermatozoa [8,12].

#### 16 *2.4 Statistical Analysis*

17 All the variables were analyzed to their normality using the Shapiro-Wilk test,  
18 and Levene test to identify homogeneity distribution of the data. Difference in sperm  
19 end points between conventional and X sorted sperm were evaluated by Student's t-  
20 test or Mann Whitney test, respectively, for parametric and non-parametric variables.  
21 The Pearson Correlation analyses was performed to determine the correlation  
22 between the sperm proAKAP4 concentration and sperm kinetics. All statistical  
23 analyses were done with Sigma Plot 14.0 software and data presented as mean ±  
24 SEM. Differences were considered significant when P < 0.05.

### 25 **3. Results**

26 All the variables analyzed presented normal distributions.

27 The X-sorted sperm had significantly lower TM and percentage of fast sperm  
28 cells (P < 0.05), but greater area when compared to the conventional sperm (Table 1).

29

1 **Table 1.** Mean ( $\pm$  SEM) values of CASA system kinetics parameters of bovine X-  
2 sorted vs. conventional sperm.

Parameters	X-sorted sperm (Mean $\pm$ SEM)	Conventional sperm (Mean $\pm$ SEM)	P value
<b>Total Motility (%)</b>	26.33 $\pm$ 4.15	49.62 $\pm$ 6.19	0.014
<b>Progressive Motility (%)</b>	19.50 $\pm$ 2.99	34.37 $\pm$ 6.81	0.100
<b>Fast sperm (%)</b>	22.17 $\pm$ 3.59	43.63 $\pm$ 6.32	0.020
<b>Static sperm (%)</b>	55.17 $\pm$ 9.43	33.25 $\pm$ 5.79	0.055
<b>VAP (<math>\mu\text{m} / \text{s}</math>)</b>	89.00 $\pm$ 4.60	92.22 $\pm$ 5.76	0.686
<b>VSL (<math>\mu\text{m} / \text{s}</math>)</b>	75.53 $\pm$ 4.19	72.00 $\pm$ 3.03	0.496
<b>VCL (<math>\mu\text{m} / \text{s}</math>)</b>	160.11 $\pm$ 8.13	157.37 $\pm$ 11.55	0.860
<b>ALH (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	7.2 $\pm$ 0.26	6.63 $\pm$ 0.41	0.264
<b>STR (%)</b>	83.67 $\pm$ 1.40	80.00 $\pm$ 3.33	0.755
<b>LIN (%)</b>	48.83 $\pm$ 1.66	49.87 $\pm$ 2.81	0.776
<b>ELONG (%)</b>	43.50 $\pm$ 1.87	41.50 $\pm$ 0.73	0.292
<b>AREA (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	7.28 $\pm$ 0.14	6.58 $\pm$ 0.13	0.013

3 VAP: travel speed; VSL: progressive speed; VCL: curvilinear speed; ALH: lateral head  
4 amplitude; STR: straightness; LIN: linearity; ELONG: elongation. Statistical  
5 significance set to  $P < 0.05$ .

6 There was no difference ( $P < 0.05$ ) in mitochondrial function, but the X-sorted  
7 sperm had higher plasmatic membrane integrity percentage (Table 2).

8 **Table 2.** Mean ( $\pm$  SEM) values of mitochondrial activity and plasmatic membrane  
9 integrity of bovine X-sorted vs. conventional sperm.

Parameters	X-sorted sperm	Conventional sperm	P value
<b>MITO (%)</b>	81.28 $\pm$ 7.05	87.91 $\pm$ 3.05	0.362
<b>PI (%)</b>	95.77 $\pm$ 1.02	85.12 $\pm$ 3.37	0.022

10 MITO: Mitochondrial activity; PI: Plasmatic membrane integrity. Statistical significance  
11 set to  $P < 0.05$ .

12 In the X-sorted sperm, the proAKAP4 concentrations ranged from 22.62 to  
13 135.53 ng/ $10^6$ spermatozoa. For the conventional sperm, the proAKAP4 minimum and

1 maximum concentrations were 12.22 and 48.29 ng/10<sup>6</sup>spermatozoa, respectively.

2 As expected, the X-sorted sperm revealed significantly higher concentrations of  
3 proAKAP4 compared to the non-sorted sperm (Table 3).

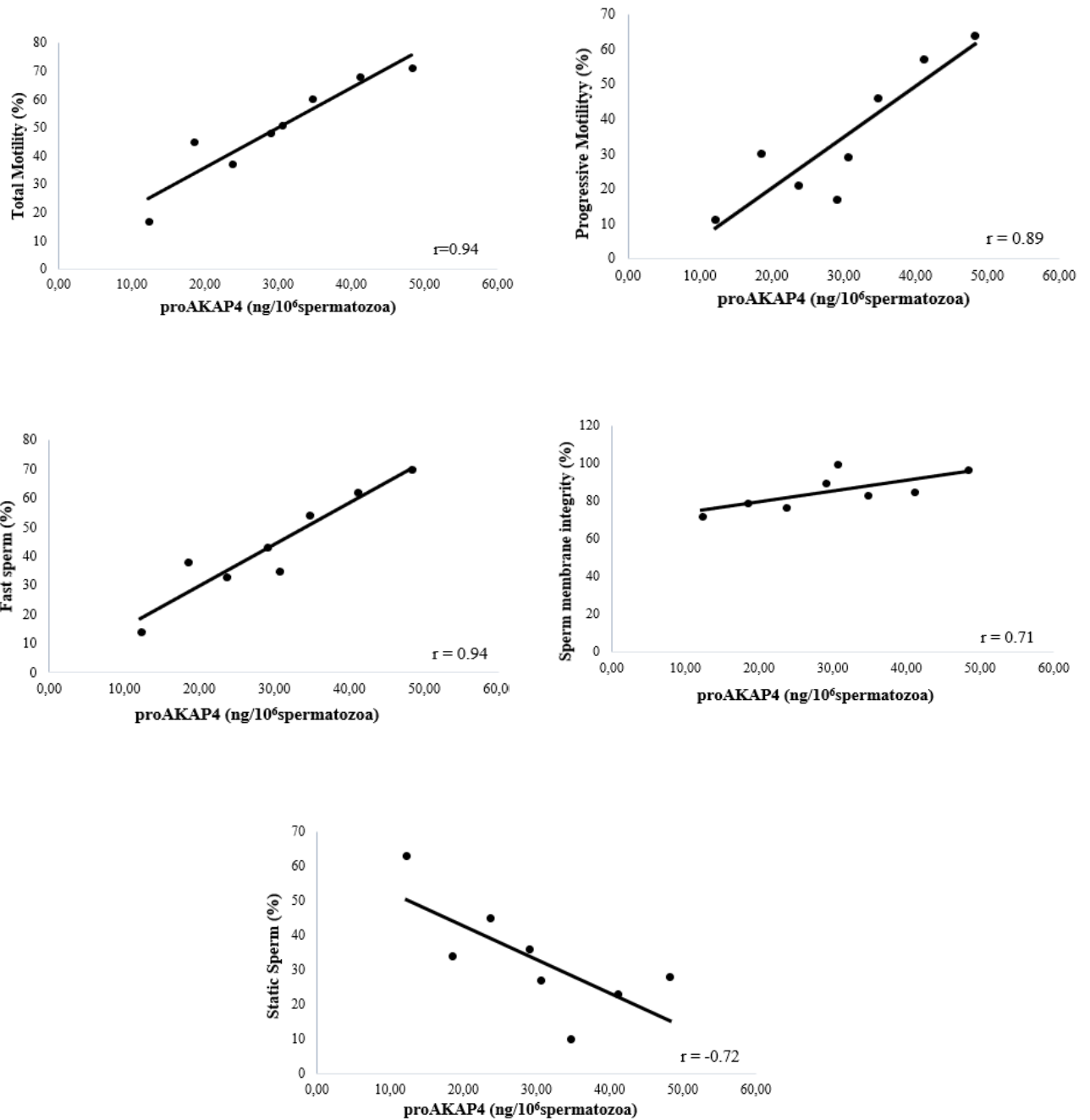
4 **Table 3.** Mean ( $\pm$  SEM) of proAKAP4 concentrations of in bovine X-sorted sperm vs.  
5 conventional sperm.

Type	ProAKAP4 (ng/10 <sup>6</sup> spermatozoa)	P value
X-sorted sperm	67.54 $\pm$ 17.40	0.033
Conventional sperm	29.76 $\pm$ 4.16	

6 In the X-sorted sperm, there was no significant correlation between proAKAP4  
7 concentration and TM ( $p=0.828$ ), PM ( $P = 0.817$ ), fast sperm ( $P = 0.876$ ), VAP ( $P =$   
8  $0.200$ ), VSL ( $P = 0.136$ ) and VCL ( $P = 0.565$ ), mitochondrial activity ( $P = 0.343$ ) or  
9 plasmatic membrane integrity ( $P = 0.280$ ).

10 In contrast, in the conventional sperm, significant positive correlations were  
11 detected between proAKAP4 and TM ( $P = 0.0004$ ,  $r = 0.941$ ), PM ( $P = 0.003$ ,  $r = 0.890$ ),  
12 fast sperm ( $P = 0.0004$ ,  $r = 0.94$ ) and sperm membrane integrity ( $P = 0.048$ ,  $r = 0.711$ ).  
13 Furthermore, a significant negative correlation was found between proAKAP4  
14 concentrations and the percentage of statistic sperm ( $P = 0.043$ ,  $r = -0.722$ ) (Figure 1).

- 1 **Figure 1.** Correlation between proAKAP4 concentration and total motility, progressive
- 2 motility, percentage of fast sperm, sperm membrane integrity and percentage of static
- 3 sperm, in conventional semen.



## 1 4. Discussion

2 Recent proteomics analysis of sex sorted sperm described that the cytoskeleton  
3 proteins, such as the AKAP's, are in greater amount in the X sorted sperm [3,13].  
4 These facts corroborate our hypothesis and results, in which a higher concentration of  
5 proAKAP4 were found in the X-sorted sperm when compared to the conventional  
6 sperm.

7 The absence of correlation between the proAKAP4 and CASA kinetics  
8 parameters for the X sorted sperm, was not foreseen. Nevertheless, previous studies  
9 have shown that the X sorted sperm are greater in weight and size when compared to  
10 the Y sorted sperm [3,14]. So, it was hypothesized that, even presenting a greater  
11 level of proAKAP4, the X-sorted sperm did not showed correlations between this  
12 protein precursor to the motility results, because of its weight, which could let the X-  
13 sorted sperm slower, besides, the injuries inherent to the sex sorting process impair  
14 sperm kinetics [3,15].

15 In addition, the proAKAP4 and AKAP4 genes are only transcribed during the  
16 spermatogenesis, and so, their concentrations are not modified after the ejaculation  
17 [5]. Since the AKAP4 is a hemizygote gene [16], the sex sorting process accumulate  
18 this protein precursor, and for this reason we suppose that the proAKAP4 may not be  
19 a reliable biomarker for the X-sorted sperm quality.

20 The lower kinetics parameters in the X-sorted sperm observed in our study  
21 corroborates the findings from a preceding study [15], which showed the decrease of  
22 fast progressive motility in sex-sorted sperm (conventional sperm=60.8% and sex-  
23 sorted sperm=25.6%). Besides, it was also observed differences in total motility  
24 between unsorted (total motility=58.1%) and sex-sorted sperm (total motility=35.2%)  
25 [17].

26 In a previous study, sex-sorted sperm have shown lower values of LIN and VAP  
27 but higher results for ALH and STR, which may characterize the sperm hyperactivation,  
28 induced by the sorting process [15]. In our investigation a hyperactive behavior was  
29 not detected, since there was no difference for the VAP, VSL, VCL, ALH, STR, or LIN  
30 parameters between the types of sperm.

31 Regarding mitochondrial functionality, the results from a foregoing study  
32 demonstrated higher mitochondria potential in the unsorted sperm [17], in contrast to  
33 our findings, which there was no difference for this parameter between the types of

1 semen evaluated. Additionally, we detected a higher percentage of sperm membrane  
2 integrity for the X sorted sperm, which opposes the results from previous research [18],  
3 that did not found any differences in this parameter between the sex-sorted and  
4 unsorted sperm, but demonstrates that the current methods for sperm sexing are  
5 already capable of maintaining the sperm membrane integrity.

6 As it was once again confirmed by the correlations detected from the  
7 conventional sperm, in a near future, the use of biomolecules such as the AKAP4  
8 protein and its precursor may become great allies in selecting breeding bulls due to  
9 their ability to predict the sperm quality and fertilizing capacity of semen doses [9,10].  
10 Another approach to be studied would be to report the proAKAP4 concentrations in Y-  
11 sorted sperm to check this protein precursor as a viable biomarker.

## 12 **5. Conclusions**

13 This is the first report of proAKAP4 concentrations in sex sorted sperm and  
14 although the proAKAP4 showed greater concentrations for the X sorted sperm, we  
15 concluded that this protein precursor seems not to be a suitable biomarker of X sorted  
16 sperm quality, since no correlations between the sperm kinetics parameters and the  
17 proAKAP4 concentrations were detected for in the X sorted sperm.

18 **Acknowledgments:** To Gabriel Crepaldi for donating the X sorted sperm straws. To  
19 Prof. Dr. André L. L. Vanzela. head of Laboratório de Citogenética e Diversidade  
20 Vegetal / UEL and his team for the use of flow cytometry equipment. To Botupharma  
21 for assisting the LARAA-UEL with products applied in this study. To CAPES for  
22 granting the postgraduation scholarships.

23 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## 24 **References**

25 [1] Batista EOS, Macedo GG, Sala R V., Ortolan MDDV, Sá Filho MF, Del Valle TA,  
26 et al. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular  
27 population in bos indicus (nelore) and bos taurus (holstein) heifers. *Reprod*

- 1           Domest Anim 2014;49:448–52. <https://doi.org/10.1111/rda.12304>.
- 2   [2]   Thomas JM, Locke JWC, Bonacker RC, Knickmeyer ER, Wilson DJ, Vishwanath  
3           R, et al. Evaluation of SexedULTRA 4M™ sex-sorted semen in timed artificial  
4           insemination programs for mature beef cows. *Theriogenology* 2019;123:100–7.  
5           <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.039>.
- 6   [3]   Scott C, Souza FF De, Aristizabal VH V, Hethrington L, Krisp C, Molloy M, et al.  
7           Proteomic profile of sex-sorted bull sperm evaluated by SWATH- MS analysis  
8           2018;198:121–8.
- 9   [4]   Morrell JM, Valeanu AS, Lundeheim N, Johannisson A. Sperm quality in frozen  
10          beef and dairy bull semen. *Acta Vet Scand* 2018;60:1–10.  
11          <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0396-2>.
- 12   [5]   Sergeant N, Briand-Amirat L, Bencharif D, Delehedde M. The Sperm Specific  
13          Protein Proakap4 as an Innovative Marker to Evaluate Sperm Quality and  
14          Fertility. *J Dairy Vet Sci* 2019;11. <https://doi.org/10.19080/jdvs.2019.11.555803>.
- 15   [6]   Turner RMO, Johnson LR, Haig-Ladewig L, Gerton GL, Moss SB. An X-linked  
16          gene encodes a major human sperm fibrous sheath protein, hAKAP82. Genomic  
17          organization, protein kinase A-RII binding, and distribution of the precursor in the  
18          sperm tail. *J Biol Chem* 1999;273:32135–41.  
19          <https://doi.org/10.1074/jbc.273.48.32135>.
- 20   [7]   Brown PR, Miki K, Harper DB, Eddy EM. A-kinase anchoring protein 4 binding  
21          proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum. *Biol Reprod* 2003;68:2241–  
22          8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013466>.
- 23   [8]   Blommaert D, Sergeant N, Delehedde M, Jouy N, Mitchell V, Franck T, et al.  
24          Expression, localization, and concentration of A-kinase anchor protein 4  
25          (AKAP4) and its precursor (proAKAP4) in equine semen: Promising marker  
26          correlated to the total and progressive motility in thawed spermatozoa.  
27          *Theriogenology* 2019;131:52–60.  
28          <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.011>.
- 29   [9]   Jumeau F, Sigala J, Dossou-Gbete F, Frimat K, Barbotin AL, Buée L, et al. A-  
30          kinase anchor protein 4 precursor (pro-AKAP4) in human spermatozoa.  
31          *Andrology* 2018;6:854–9. <https://doi.org/10.1111/andr.12524>.
- 32   [10]   Riesco MF, Anel-Lopez L, Neila-Montero M, Palacin-Martinez C, Montes-Garrido  
33          R, Alvarez M, et al. Proakap4 as novel molecular marker of sperm quality in ram:  
34          An integrative study in fresh, cooled and cryopreserved sperm. *Biomolecules*

- 1 2020;10:1–21. <https://doi.org/10.3390/biom10071046>.
- 2 [11] Ruelle I, Seregeant N, Bencharif D, Charreaux F, Thorin C, Michaud S, et al. 145  
3 ProAKAP4 concentrations in semen as a predictive tool of bull fertility: A  
4 preliminary study. *Reprod Fertil Dev* 2020;32:199.  
5 <https://doi.org/10.1071/rdv32n2ab145>.
- 6 [12] Bastan I, Akcay E. Quality assessment of frozen bull semen with the precursor  
7 kinase anchor protein 4 biomarker 2021:1–8. <https://doi.org/10.1111/and.14164>.
- 8 [13] De Canio M, Soggiu A, Piras C, Bonizzi L, Galli A, Urbani A, et al. Differential  
9 protein profile in sexed bovine semen: Shotgun proteomics investigation. *Mol*  
10 *Biosyst* 2014;10:1264–71. <https://doi.org/10.1039/c3mb70306a>.
- 11 [14] Boro P, Naha BC, Madkar A. Sexing of semen in bulls: A mini review  
12 2016;2:460–2.
- 13 [15] Steele H, Makri D, Maalouf WE, Reese S, Kölle S. Bovine Sperm Sexing Alters  
14 Sperm Morphokinetics and Subsequent Early Embryonic Development. *Sci Rep*  
15 2020;10:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63077-6>.
- 16 [16] Fang X, Huang LL, Xu J, Ma CQ, Chen ZH, Zhang Z, et al. Proteomics and  
17 single-cell RNA analysis of Akap4-knockout mice model confirm indispensable  
18 role of Akap4 in spermatogenesis. *Dev Biol* 2019;454:118–27.  
19 <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.06.017>.
- 20 [17] Carvalho J de O, Sartori R, Rodello L, Mourão GB, Bicudo SD, Margot MA. Flow  
21 cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their  
22 capacity to bind to oviductal cells. *Livest Sci* 2018;207:30–7.  
23 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.11.005>.
- 24 [18] González-Marín C, Góngora CE, Gilligan TB, Evans KM, Moreno JF,  
25 Vishwanath R. In vitro sperm quality and DNA integrity of SexedULTRA™ sex-  
26 sorted sperm compared to non-sorted bovine sperm. *Theriogenology*  
27 2018;114:40–5. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.03.025>.

1 **6 ARTIGO 2** – O manuscrito a seguir foi redigido de acordo com as normas do  
2 periódico científico Animal Reproduction Science. As normas estão disponíveis no  
3 link: [https://www.elsevier.com/journals/animal-reproduction-science/0378-](https://www.elsevier.com/journals/animal-reproduction-science/0378-4320/guide-for-authors)  
4 [4320/guide-for-authors](https://www.elsevier.com/journals/animal-reproduction-science/0378-4320/guide-for-authors)

5 **The proAKAP4 concentrations in *Bos indicus* bull sperm and its relation to TAI**  
6 **pregnancy rate results**

7  
8 Ana Beatriz Marques de Almeida<sup>1</sup>; Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo<sup>1</sup>; Fábio Lucas  
9 Zito de Moraes<sup>2</sup>; Luiz Guilherme Corsi Trautwein<sup>1</sup>; Josiana de Fátima Schnitzer<sup>1</sup>;  
10 Letícia Amanda dos Santos Silva<sup>1</sup>; João Carlos Pinheiro Ferreira<sup>3</sup>; Maria Isabel Mello  
11 Martins<sup>4\*</sup>

12 <sup>1</sup> LARAA – Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida da Universidade  
13 Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná-Brazil.

14 <sup>2</sup> Self-employed Veterinarian, Londrina, Paraná-Brazil.

15 <sup>3</sup> Professor at the Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction - School of  
16 Veterinary Medicine and Animal Science of the Sao Paulo State University – UNESP,  
17 Botucatu, São Paulo – Brazil.

18 <sup>1,4</sup> Professor at the Department of Animal Clinics of the Universidade Estadual de Londrina -  
19 UEL, Londrina, Paraná-Brazil.

20 \*Correspondence: [imartins@uel.br](mailto:imartins@uel.br)

21 **Abstract:** The AKAP4 protein has an essential role in sperm motility, and its precursor,  
22 the proAKAP4, is considered a biomarker for sperm quality and fertility. Despite this,  
23 proAKAP4 concentration was never evaluated in *Bos indicus* sperm. This study aimed  
24 to determine the proAKAP4 concentration of Nellore bulls' sperm and its relation with  
25 sperm kinetics, morpho-functionality, morphology, and pregnancy rates after fixed-time  
26 artificial insemination (FTAI). Fifteen hundred and seven multiparous Nellore cows  
27 were inseminated with frozen-thawed semen from the same sperm batches of nine  
28 Nellore bulls. These batches were also evaluated regarding their sperm kinetics by  
29 CASA system, mitochondrial functionality, and sperm membrane integrity and  
30 morphology. Additionally, the sperm proAKAP4 concentration was determined using  
31 an ELISA kit. To assure the impact and relation between the proAKAP4 and the sperm

1 analysis and fertility, a linear regression was conducted, and the significance level was  
2 set to 5%. The conception rate presented 52.52% of mean value. The mean proAKAP4  
3 concentration was 25.75 ng/10<sup>6</sup> spermatozoa. The proAKAP4 showed to influence the  
4 sperm total and progressive motility (TM:  $r^2 = 0.49$ ,  $P = 0.03$ ); PM:  $r^2 = 0.63$ ,  $P=0.01$ ),  
5 besides to impact in the conception rates from FTAI ( $r^2 = 0.51$ ,  $P=0.03$ ). With this study,  
6 it was possible to conclude that the proAKAP4 is a suitable biomarker to predict the  
7 quality and fertility of Nelore sperm.

8 **Key-words:** AKAP4 protein; Artificial insemination; Biomarker; Fertility; Nelore bulls.

## 9 1. Introduction

10 The fixed-timed artificial insemination (FTAI) is one of the reproductive  
11 biotechnology most applied for beef cows, because it eliminates the necessity for  
12 estrus detection and improves the herd genetic gains (Baruselli et al., 2018; Baruselli  
13 et al., 2017). Although the success in the FTAI programs is due to a multifactorial  
14 causes, the bull sperm plays a critical role in achieving satisfactory pregnancy rates  
15 (Fair and Lonergan, 2018; Mohanty et al., 2018; Pfeifer et al., 2019).

16 *In vitro* analyses, such as spermatoc kinetics and morphology evaluations, are  
17 strictly required for a sperm sample before its use in the reproductive programs (Fair  
18 and Lonergan, 2018; Okano et al., 2019). However, these analysis are not accurate  
19 enough to predict the field fertility of a semen match, and ejaculates from subfertile  
20 bulls can be possible be used artificial insemination, compromising its results (Fair and  
21 Lonergan, 2018; Morado et al., 2015; Okano et al., 2019; Sergeant et al., 2019).

22 Researchers seek proteomic biomarkers related to fertility to improve the sperm *in*  
23 *vitro* evaluation (Okano et al., 2019; Sergeant et al., 2019). The AKAP4 protein (kinase

1 anchor protein 4) is foregrounding as possible biomarker for sperm quality and fertility  
2 (Delehedde et al., 2019; Sergeant et al., 2019).

3 The AKAP4 and its precursor (proAKAP4) are highly conserved in the mammalian  
4 sperms. ProAKAP4 is transcribed in spermatids during spermiogenesis and is the  
5 most abundant protein in the spermatic flagellum fibrous sheath (Blommaert et al.,  
6 2019; Brown et al., 2004; Jumeau et al., 2018). Besides its structural role, AKAP4 and  
7 proAKAP4 participate in the sperm motility process (Blommaert et al., 2019; Turner et  
8 al., 1999).

9 The sperm concentrations of proAKAP4 have been described in stallions  
10 (Blommaert et al., 2019), rams (Riesco et al., 2020), dogs (Langlade et al., 2020) and  
11 humans (Jumeau et al., 2018). In *Bos taurus* bulls, previous investigations showed that  
12 proAKAP4 is a sperm quality biomarker (Bastan and Akcay, 2021; Ruelle et al., 2020).  
13 However, the sperm concentration of proAKAP4 and its relationship to the fertility rates  
14 in *Bos indicus* bulls are unknown.

15 Therefore, our objective was to determine the proAKAP4 concentrations in *Bos*  
16 *indicus* bulls' sperm and their correlations with sperm kinetics and morpho-functional  
17 parameters and conception rates achieved after an FTAI program.

## 18 **2. Material and Methods**

19 The present investigation was approved by the Universidade Estadual de  
20 Londrina Ethics Committee on the Use of Animals - CEUA / UEL number  
21 22460.2018.26.

### 22 **2.1 Sperm samples**

23 To this experiment, it was used nine commercial cryopreserved sperm straws

1 containing 250µL of sperm sample, presenting mean concentration of 38.47x  
2 10<sup>6</sup>spermatozoa/mL. The samples were from nine different Nelore bulls (*Bos taurus*  
3 *indicus*), being of the same batches of the straws applied for the FTAI.

#### 4 **2.2 Sperm analysis**

5 After thawing (37°C/30 s), 3 µL of semen were allocated in a Cell-Vu® chamber  
6 (Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA) and covered by a coverslip preheated at 37°C  
7 and analyzed by Computer Assisted Sperm Analysis (CASA- Hamilton-Thorne IVOS,  
8 Beverly, MA, USA, version 14.0) (CASA bovine setup parameters-values: Frames  
9 Acquired- 30, Frame Rate (Hz) - 60, Minimum Cell Size (Pixels) - 5, Minimum Static  
10 Contrast- 30, Straightness (STR) Threshold (%) - 70, VAP cut-off (µm / s) - 30, Prog.  
11 Min VAP (µm /s) - 50, VSL cut-off (µm / s) - 15), were used to access the sperm kinetics  
12 parameters. The CASA evaluation included: Total Motility (% TT); Progressive Motility  
13 (% PM); Fast Sperm (% Rapid); Slow Sperm (% Slow), Travel Speed (µm/s VAP);  
14 Progressive Speed (µm/s VSL); Curvilinear Speed (µm/s VCL); Lateral Head  
15 Amplitude (µm ALH); Straightness (% STR); Linearity (% LIN). From the results  
16 provided by the CASA system, it was possible to calculate the sperm oscillation  
17 movement (wobble (%) - WOB =  $VAP/VCL \times 100$ ) and dance ( $VCL \times ALH (\mu m^2)$ ).

18 For flow cytometry, 100 µL of sperm sample were diluted in Tyrode albumin  
19 lactate pyruvate medium to a concentration of 5 x 10<sup>6</sup> spermatozoa/mL, divided into  
20 two microtubes and kept at 37°C.

21 For assessment of sperm mitochondrial functionality (MITO - %), 20 µM of the  
22 MitoTracker Red CMXRos (M-7512; Molecular Probes, Eugene, OR) was added and  
23 homogenized to the first sperm sample microtube. For assessment of sperm  
24 membrane integrity (PI - %), 15 µM of Propidium Iodide (0.5 m/mL, L0770, Sigma-

1 Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA) was added to the second tube. The  
2 mitochondrial activity and the sperm membrane integrity analysis were conducted in  
3 the BD Accuri C6™ flow cytometer (Beckton-Dickeson, San Jose, USA), equipped with  
4 an argon laser (488nm pass) and a red laser (640nm range). In each analysis, 10,000  
5 cells were evaluated.

6 The sperm morphology analysis was performed in a smear stained by eosin-  
7 nigrosin dye (BotuVital®, Botupharma, Botucatu – São Paulo, Brazil) and evaluated  
8 under light microscopy (1,000X magnification - CX3, Olympus®). In each slide, 200  
9 cells were ranked as morphological normal or abnormal (Barth and Oko, 1989) Sperm  
10 were classified as normal or presenting minor and major defects.

## 11 **2.2 Sperm proAKAP4 concentration**

12 Sperm proAKAP4 concentration was determined using an ELISA kit (Bull 4MID  
13 kit®, 4BioDx, 4VDX-18K3, France), according to manufacturers' instructions. Briefly,  
14 50 µL of each frozen-thawed sperm sample was added to a microtube with the assay  
15 lysis buffer. Then, the lysed sperm were added to a 96-well plate re-coated with  
16 proAKAP4 antibody, and the microplate was incubated at 24°C (room temperature) for  
17 2 hours. After that, the plate was sequentially washed, dried, received the detection  
18 antibody buffer in its wells, and incubated again at room temperature for 1 hour. Next,  
19 a new wash was performed, the substrate solution was added, and the microplate was  
20 incubated for 10 minutes at 24°C. The stop solution was added to the wells to finalize  
21 the assay, and the optical density was detected in an ELISA microplate reader set to  
22 450nm. The proAKAP4 concentration are expressed as ng/10<sup>6</sup> spermatozoa.

### 1        **2.3 Timed artificial insemination**

2        In the field trial, 1507 multiparous Nelore cows , 2-10 year old, with a mean body  
3        score condition (BCS) of 2.7 (1-5 point scale; Ayres et al., 2009) from four livestock  
4        farms located in the southeast region of Brazil were used in two consecutive breeding  
5        seasons during the summer, were used. Nutritional management includes pasture  
6        (*Urochloa brizantha*), mineral supplement and water *ad libitum*.

7        Cow's estrous cycles were synchronized by 2 mg of estradiol benzoate i.m.  
8        (Fertilcare Synchronization®; MSD Animal Health) and insertion of an intravaginal  
9        device containing 1.2 g of progesterone (P4) (Fertilcare Implante 1200®; MSD Saúde  
10        Animal). Then, 8 d later (D8), 2 mg of sodium cloprostenol (Stroncloprostenol®; Agener  
11        União Saúde Animal), 0.5 mg of estradiol cypionate (Fertilcare Ovulation®; MSD  
12        Animal Health) and 300 IU of equine chorionic gonadotropin (Folligon®; MSD Animal  
13        Health) were given i.m. and the P4 device was withdrawn. Forty-eight hours later (D10)  
14        the artificial inseminations (AI) were performed (D10).

15        In all AI, cows were inseminated with sperm from the same matches evaluated  
16        in the laboratory. The average number of inseminations per match was 167.44 females  
17        (minimum: 26, maximum: 429).

18        The pregnancy diagnosis was performed thirty days after AI by rectal  
19        ultrasonography (Aloka SSD- 500®, 5.0 MHz). The conception rates (CR) were  
20        calculated by the relation between the pregnant cows and the females inseminated  
21        (CR=pregnant cows/females inseminated).

### 22        **2.4 Statistical analysis**

23        To evaluate the effect of the BCS, farm, breeding season and bull on conception  
24        rates, a generalized linear model was conducted. The significance level was set to  
25         $P < 0.05$ .

1 The data were submitted to the Shapiro-Wilk and the Levene test to assure its  
2 normal distribution and homogeneity, respectively.

3 The relations and effects between the proAKAP4 concentrations and the sperm  
4 kinetics, morphology, morpho functionality and CR were measured by linear  
5 regressions, being the proAKAP4 concentrations an independent variable, and the  
6 conception rates were categorized as a dependent characteristic. The statistical  
7 analysis was run in the Sigma Plot 14.0 software, and the significance threshold was  
8  $P > 0.05$ .

### 9 **3. Results**

10 All the variables evaluated in this study presented a normal distribution.

11 The results of sperm kinetics, morphology, mitochondrial functionality, and  
12 membrane integrity are described in the Table 1.

13 The mean proAKAP4 concentrations in Nellore bull's sperm were 25.75  
14 ng/ $10^6$ spermatozoa (12.21 to 48.28 ng/ $10^6$  spermatozoa). These results are exposed  
15 on Table 2.

16 The FTAI resulted in a mean conception rate (CR) of 52.52% (40.18 to 61.53%).  
17 There was an effect of bull ( $P = 0.0004$ ) and breeding season ( $P = 0.033$ ) on CR, but  
18 not effect of BCS ( $P = 0.293$ ) or farm ( $P = 0.245$ ).

19 The proAKAP4 concentrations presented effect on the main kinetics  
20 parameters: TM ( $r^2 = 0.49$ ,  $P = 0.03$ ), PM ( $r^2 = 0.63$ ,  $P = 0.01$ ) and percentage fast sperm  
21 ( $r^2 = 0.50$ ,  $P = 0.03$ ) (Figure 2). Also, the proAKAP4 concentrations negatively  
22 influenced the percentage of slow sperm cells ( $r = -0.74$ ,  $P = 0.003$ ) (Figure 2).

23 No significant relations were detected between proAKAP4 concentrations and  
24 the percentage of major ( $P = 0.95$ ), minor ( $P = 0.93$ ) or total defects ( $P = 0.97$ ). Also,

1 there was no significant effect of proAKAP4 concentrations with mitochondrial  
2 functionality ( $P = 0.32$ ) and sperm membrane integrity ( $P = 0.10$ ).

3 The proAKAP4 concentrations showed a predictive potential on the CR results ( $r^2$   
4  $= 0.51$ ,  $P=0.03$ ) (Figure 2).

#### 5 **4. Discussion**

6 This is the first report of the proAKAP4 concentrations in *Bos indicus* frozen-  
7 thawed sperm. Our results reaffirm the use of proAKAP4 as a sperm quality and fertility  
8 biomarker.

9 Our results revealed that besides the effect of the bull over the conception rates,  
10 the breeding season also impacted on the CR. These divergences occur due to the  
11 lower pluviometry index between the years. Since the pasture suffers influences of the  
12 climate seasonality, it may interfere in the reproductive results of FTAI (Negreiros et  
13 al., 2020; Reese et al., 2020).

14 The proAKAP4 relates to the conception rates, besides of all the sperm  
15 parameters evaluated *in vitro*, only the proAKAP4 showed impact on the conception  
16 rate, highlighting the great potential of this protein precursor as a fertility biomarker.  
17 These data corroborate previous findings, which presented a correlation between the  
18 proAKAP4 and the non-return of estrus rate (NRR - %) after 90 days of the artificial  
19 insemination, and also, the proAKAP4 showed was the unique sperm parameter to  
20 influence the NRR (Ruelle et al., 2020).

21 In the present analysis the proAKAP4 influenced the kinetics parameters such  
22 as MOT, MOTP, Fast sperm and Slow sperm. Earlier data described correlations  
23 between the sperm motility and the proAKAP4 in Holstein bulls sperm ( $r=0.52$ ) (Ruelle  
24 et al., 2020). Other study, detected correlations between the proAKAP4 and the sperm

1 motility (total motility:  $r=0.52$  and progressive motility:  $r=0.69$ ), but this relation  
2 happened after 3 hours of sperm incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  (Bastan & Akcay, 2021). So far,  
3 in the cryopreserved sperm of stallions, the relations for proAKAP4 and motility  
4 ( $r=0.76$ ) as to progressive motility ( $r=0.66$ ) was described (Blommaert et al., 2019).

5 In this study, the proAKAP4 did not impacted on others kinetics parameters such  
6 as VAP, VSL, VCL, LIN and BCF. In contrast, Bastan & Akcay, (2021) identified weak  
7 correlations between proAKAP4, VCL and VSL in frozen-thawed sperm. Also, Ruelle  
8 et al. (2020) found that the proAKAP4 may relate to LIN and BCF.

9 Our study showed no relations between the sperm morpho-functionality and  
10 morphological parameters to the proAKAP4 expression, findings similar to those  
11 reported in men (Jumeau et al., 2018). In comparison, a negative correlation between  
12 the proAKAP4 and the sperm tail defects was described, and no correlations with  
13 sperm membrane integrity (Bastan and Akcay, 2021).

14 The proAKAP4 detected in this analysis was lower ( $25.75\pm 12.45$   
15  $\text{ng}/10^6$ spermatozoa) than the results of a previous study, which described a mean  
16 concentration of  $38.92 \pm 7.11 \text{ ng}/10^6$  spermatozoa in the sperm of Simmental (*Bos*  
17 *taurus*) bulls (Bastan and Akcay, 2021). Nevertheless, our proAKAP4 results find in  
18 the interval described by in the Holstein bulls sperm, that range between 8.62 to 95.5  
19  $\text{ng}/10^6$ spermatozoa (Ruelle et al., 2019).

20 The lower expression of proAKAP4 found in the present study may be due to the  
21 sperm subspecies differences. These results point the necessity of future studies to  
22 compare the proAKAP4 sperm concentrations between *Bos taurus* and *Bos indicus*  
23 bulls.

24 According to the literature, the AKAP4 protein anchors the protein kinase A (PKA)  
25 in subcellular places and so conducts the PKA near to its substrates, inducing the

1 phosphorylation of the cAMP dependents proteins, a crucial role in the sperm motility  
2 mechanism (Bastan and Akcay, 2021; Blommaert et al., 2019; Brown et al., 2004;  
3 Moretti et al., 2007; Turner et al., 1999). This information supports the influence exerted  
4 by the proAKAP4 on the motility parameters provided by the CASA system.

5 In the future, the use of the proAKAP4 as a biomarker may be a helpful tool in the  
6 selection of bulls and ejaculates to be applied in the reproductive biotechnologies.

## 7 **5. Conclusions**

8 The results described in this investigation assure the influence that the proAKAP4  
9 executes on the sperm motility parameters and that the polypeptide concentrations  
10 impacts on the conception rates. Therefore, we can conclude that the proAKAP4 is a  
11 very suitable biomarker to achieve the sperm quality and fertility of *Bos indicus* bulls.

12 **Acknowledgments:** To Prof. Dr. André L. L. Vanzela. head of Laboratório de  
13 Citogenética e Diversidade Vegetal / UEL and his team for the use of flow cytometry  
14 equipment. To Botupharma for assisting the LARAA-UEL with products applied in this  
15 study. To CAPES for granting the postgraduation scholarships.

16 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## 17 **References**

18 Ayres, H., Ferreira, R.M., de Souza Torres-Júnior, J.R., Demétrio, C.G.B., de Lima,  
19 C.G., Baruselli, P.S., 2009. Validation of body condition score as a predictor of  
20 subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. *Livest. Sci.* 123, 175–179.  
21 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.11.004>

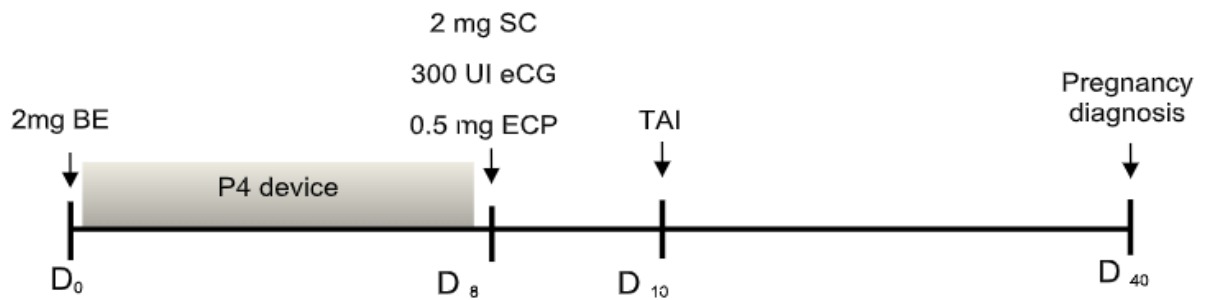
- 1 Barth, A.D., Oko, R.J., 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Wiley,  
2 Reino Unido.
- 3 Baruselli, P.S., Ferreira, R.M., Colli, M.H.A., Elliff, F.M., Sá Filho, M.F., Vieira, L., de  
4 Freitas, B.G., 2017. Timed artificial insemination: Current challenges and recent  
5 advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. *Anim.*  
6 *Reprod.* 14, 558–571. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR999>
- 7 Baruselli, P.S., Ferreira, R.M., Sá Filho, M.F., Bó, G.A., 2018. Review: Using artificial  
8 insemination v. natural service in beef herds. *Animal* 12, s45–s52.  
9 <https://doi.org/10.1017/S175173111800054X>
- 10 Bastan, I., Akcay, E., 2021. Quality assessment of frozen bull semen with the precursor  
11 kinase anchor protein 4 biomarker 1–8. <https://doi.org/10.1111/and.14164>
- 12 Blommaert, D., Sergeant, N., Delehedde, M., Jouy, N., Mitchell, V., Franck, T., Donnay,  
13 I., Lejeune, J.P., Serteyn, D., 2019. Expression, localization, and concentration of  
14 A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) and its precursor (proAKAP4) in equine  
15 semen: Promising marker correlated to the total and progressive motility in thawed  
16 spermatozoa. *Theriogenology* 131, 52–60.  
17 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.011>
- 18 Brown, P.R., Miki, K., Harper, D.B., Eddy, E.M., 2004. A-Kinase Anchoring Protein 4  
19 Binding Proteins in the Fibrous Sheath of the Sperm Flagellum. *Biol. Reprod.* 68,  
20 2241–2248. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013466>
- 21 Delehedde, M., Carracedo, S., Selleslagh, M., Eddarkaoui, S., Amirat-briand, L.,  
22 Sergeant, N., 2019. ProAKAP4 polypeptide as a biomarker of sperm functionality  
23 and male fertility disorders 2, 13–19.
- 24 Fair, S., Lonergan, P., 2018. Review: Understanding the causes of variation in  
25 reproductive wastage among bulls. *Animal* 12, s53–s62.

- 1        <https://doi.org/10.1017/S1751731118000964>
- 2    Jumeau, F., Sigala, J., Dossou-Gbete, F., Frimat, K., Barbotin, A.L., Buée, L., Béhal,  
3        H., Sergeant, N., Mitchell, V., 2018. A-kinase anchor protein 4 precursor (pro-  
4        AKAP4) in human spermatozoa. *Andrology* 6, 854–859.  
5        <https://doi.org/10.1111/andr.12524>
- 6    Langlade, C., Buff, S., Dias, C., Commin, L., 2020. Assessment of Optimized  
7        Frozen/Thawed Semen Samples in Canines with the New A-Kinase Anchor  
8        Protein 4 Precursor Biomarker. *Biopreserv. Biobank.* 18, 409–414.  
9        <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0019>
- 10    Mohanty, T.K., Lone, S.A., Kumaresan, A., Bhakat, M., Kumar, R., Baithalu, R.K.,  
11        Sinha, R., Paray, A.R., Yadav, H.P., Sahu, S.K., Mohanty, A.K., 2018. Sperm  
12        dosage and site of insemination in relation to fertility in bovines. *Asian Pacific J.*  
13        *Reprod.* 7, 1–5. <https://doi.org/10.4103/2305-0500.220977>
- 14    Morado, S., Pereyra, V., Breininger, E., Sara, R., Cetica, P., 2015. Study of Sperm  
15        Evaluation Parameters to Estimate Cryopreserved Bovine Semen Fertility. *Austin*  
16        *J Vet Sci Anim Husb.* *Austin J Vet Sci Anim Husb* 2, 1005–1.
- 17    Moretti, E., Scapigliati, G., Pascarelli, N.A., Baccetti, B., Collodel, G., 2007.  
18        Localization of AKAP4 and tubulin proteins in sperm with reduced motility. *Asian*  
19        *J. Androl.* 9, 641–649. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00267.x>
- 20    Negreiros, M.P.M., Seugling, G.H.F., Almeida, A.B.M., Hidalgo, M.M.T., Martins, M.  
21        isabel M., Blaschi, W., Barreiros, T.R.R., 2020. Influence of nutritional and ovarian  
22        parameters on pregnancy rates of Nelore cows artificially inseminated at fixed  
23        time. *Res. Soc. Dev.* 9, 1–18.
- 24    Okano, D.S., Penitente-Filho, J.M., Gomez León, V.E., Maitan, P.P., Silveira, C.O.,  
25        Waddington, B., Díaz-Miranda, E.A., da Costa, E.P., Guimarães, S.E.F.,

- 1       Guimarães, J.D., 2019. In vitro evaluation of cryopreserved bovine sperm and its  
2       relation to field fertility in fixed-time artificial insemination. *Reprod. Domest. Anim.*  
3       54, 604–612. <https://doi.org/10.1111/rda.13401>
- 4       Pfeifer, L.F.M., Júnior, J.S.O., Potiens, J.R., 2019. Effect of sperm kinematics and size  
5       of follicle at ovulation on pregnancy rate after timed AI of beef cows. *Anim. Reprod.*  
6       Sci. 201, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.12.009>
- 7       Reese, S.T., Franco, G.A., Poole, R.K., Hood, R., Fernandez Montero, L., Oliveira Filho,  
8       R. V., Cooke, R.F., Pohler, K.G., 2020. Pregnancy loss in beef cattle: A meta-  
9       analysis. *Anim. Reprod. Sci.* 212, 106251.  
10       <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106251>
- 11       Riesco, M.F., Anel-Lopez, L., Neila-Montero, M., Palacin-Martinez, C., Montes-  
12       Garrido, R., Alvarez, M., de Paz, P., Anel, L., 2020. Proakap4 as novel molecular  
13       marker of sperm quality in ram: An integrative study in fresh, cooled and  
14       cryopreserved sperm. *Biomolecules* 10, 1–21.  
15       <https://doi.org/10.3390/biom10071046>
- 16       Ruelle, I., Charreaux, F., Bencharif, D., Thorin, C., Michaud, S., Schmitt, E., Sergeant,  
17       N., Briand-Amirat, L., Delehedde, M., 2019. Assessment of the sperm specific  
18       protein proAKAP4 as a marker to evaluate sperm quality and fertility in Holstein  
19       bulls. *Rev. Bras. Reprodução Anim.* 43, 472.
- 20       Ruelle, I., Seregeant, N., Bencharif, D., Charreaux, F., Thorin, C., Michaud, S., Dordas-  
21       Perpinyà, M., Jouy, N., Audry, S., Maurage, C., Delehedde, M., Briand-Amirat, L.,  
22       2020. 145 ProAKAP4 concentrations in semen as a predictive tool of bull fertility:  
23       A preliminary study. *Reprod. Fertil. Dev.* 32, 199.  
24       <https://doi.org/10.1071/rdv32n2ab145>
- 25       Sergeant, N., Briand-Amirat, L., Bencharif, D., Delehedde, M., 2019. The Sperm

1 Specific Protein Proakap4 as an Innovative Marker to Evaluate Sperm Quality and  
2 Fertility. *J. Dairy Vet. Sci.* 11. <https://doi.org/10.19080/jdvs.2019.11.555803>  
3 Turner, R.M.O., Johnson, L.R., Haig-Ladewig, L., Gerton, G.L., Moss, S.B., 1999. An  
4 X-linked gene encodes a major human sperm fibrous sheath protein, hAKAP82.  
5 Genomic organization, protein kinase A-RII binding, and distribution of the  
6 precursor in the sperm tail. *J. Biol. Chem.* 273, 32135–32141.  
7 <https://doi.org/10.1074/jbc.273.48.32135>

Figure 1: Graphical representation of the TAI protocol and pregnancy diagnosis performed in all the 1507 Nellore cows.



BE: estradiol benzoate; P4 device: progesterone releasing intravaginal device; SC: sodium cloprostenol; eCG: equine chorionic gonadotropin; ECP: estradiol cypionate; TAI: timed artificial insemination.

Table 1: Kinetics, morphology and morpho-functionality results from the nine frozen thawed Nellore sperm samples.

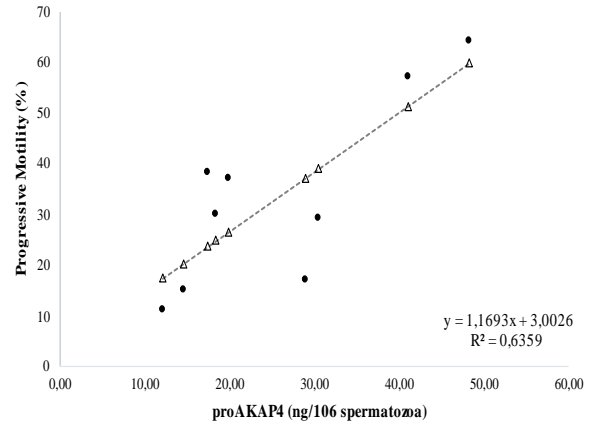
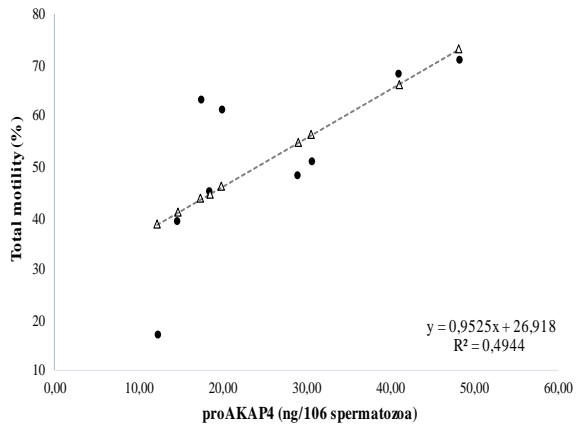
<b>Parameters</b>	<b>Mean±SEM</b>
<b>Total Motility (%)</b>	51.44±5.62
<b>Progressive Motility (%)</b>	33.11±6.08
<b>Fast sperm (%)</b>	45.22±5.64
<b>Slow sperm (%)</b>	17.11±2.55
<b>VAP (µm / s)</b>	93.09±5.01
<b>VSL (µm / s)</b>	70.06±2.90
<b>VCL (µm / s)</b>	163.83±11.16
<b>ALH (µm)</b>	7.05±0.43
<b>STR (%)</b>	77.44±3.39
<b>LIN (%)</b>	46.88±3.08
<b>WOB (%)</b>	57.27±4.14
<b>DANCE (µm<sup>2</sup>)</b>	1192.50±148.67
<b>Major defects (%)</b>	5.55±0.68
<b>Minor defects (%)</b>	3.88±0.77
<b>Total defects (%)</b>	9.44±1.02
<b>MITO (%)</b>	87.44±2.78
<b>PI (%)</b>	87.35±2.78

SEM: Standard error; VAP: travel speed; VSL: progressive speed; VCL: curvilinear speed; ALH: lateral head amplitude; STR: straightness; LIN: linearity; MITO: Mitochondrial activity; PI: Plasmatic membrane integrity.

Table 2: The proAKAP4 concentrations and its respective conception rate from each bull evaluated

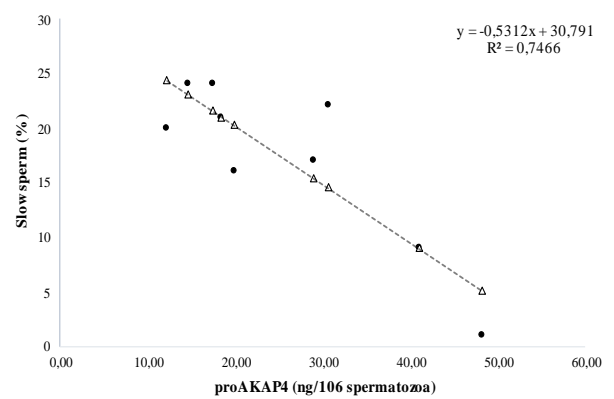
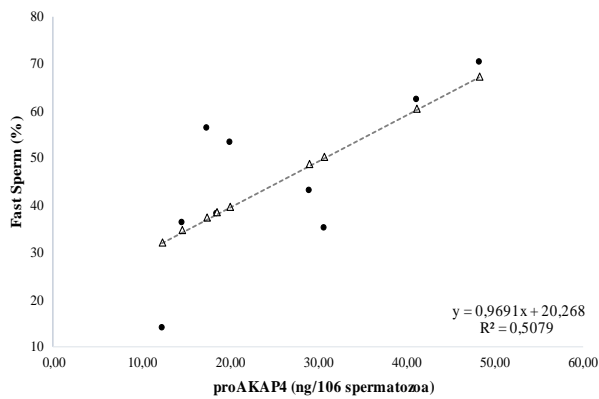
<b>Bull</b>	<b>ProAKAP4 concentration (ng/10<sup>6</sup> spermatozoa)</b>	<b>Conception rate (%)</b>
<b>1</b>	18.49	51,66
<b>2</b>	17.45	48.31
<b>3</b>	41.11	56.17
<b>4</b>	19.94	40.18
<b>5</b>	29.02	61.53
<b>6</b>	30.61	57.25
<b>7</b>	48.29	61.22
<b>8</b>	14.63	44.98
<b>9</b>	12.22	51.33

Figure 2: Graphical representation of the regression coefficient and equation between the proAKAP4 concentrations and total motility, progressive motility, fast sperm, slow sperm and pregnancy rate.



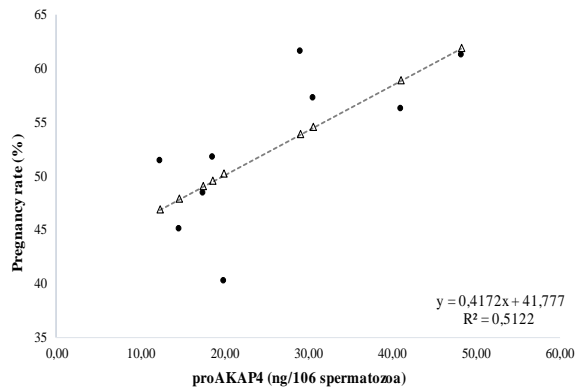
● Total motility (%)    Δ Previsto(a) Total motility (%)    - - - - Linear (Total motility (%))

● Progressive Motility (%)    Δ Previsto(a) Progressive Motility (%)    - - - - Linear (Progressive Motility (%))



● Fast Sperm (%)    Δ Previsto(a) Fast Sperm (%)    - - - - Linear (Fast Sperm (%))

● Slow sperm (%)    Δ Previsto(a) Slow sperm (%)    - - - - Linear (Slow sperm (%))



● Pregnancy rate (%)    Δ Previsto(a) Pregnancy rate (%)    - - - - Linear (Pregnancy rate (%))

## 1 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

2                   Sendo este o primeiro relato da aplicabilidade da proAKAP4 em doses  
3 de sêmen de touros *Bos indicus* e amostras sexadas, foi possível elucidar a eficácia  
4 da proAKAP4 como biomarcador de qualidade e fertilidade.

5                   Embora as concentrações de proAKAP4 tenham se mostrado maiores  
6 em sêmen sexado para fêmea, observou-se que este biomarcador não é fidedigno  
7 para avaliar a qualidade e fertilidade deste tipo de sêmen, por não se relacionar aos  
8 parâmetros cinéticos e por ser codificado pelo cromossomo X. Contudo, experimentos  
9 futuros podem ser conduzidos para validar a eficácia do marcador proteico em questão  
10 nas doses de sêmen sexadas carreadoras do cromossomo Y.

11                   Entretanto, em doses de sêmen convencionais, a proAKAP4 foi  
12 validada como um biomarcador de qualidade, ao se correlacionar com as  
13 características da cinética espermática. Além disso, a proAKAP4 pode ser utilizada  
14 para prever a fertilidade de doses criopreservadas de touros *Bos indicus*, pois  
15 influenciou as taxas de concepção obtidas em programa de IATF.

16                   Futuramente, a proAKAP4 irá agregar as avaliações seminais  
17 realizadas *in vitro*, e será uma ferramenta de grande auxílio na seleção de touros  
18 férteis a serem empregados em biotecnologias reprodutivas.