



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MYRIAN MEGUMY TSUNOKAWA HIDALGO

**RELAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS EM
TOUROS NELORES E ANGUS COM TAXA DE
GESTAÇÃO NA IATF**

MYRIAN MEGUMY TSUNOKAWA HIDALGO

**RELAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS EM
TOUROS NELORES E ANGUS COM TAXA DE
GESTAÇÃO NA IATF**

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Mello Martins.

Londrina
2020

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

H632 Hidalgo, Myrian Megumy Tsunokawa.

Relação das subpopulações espermáticas em touros Nelore e Angus com taxas de gestação na IATF / Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo. - Londrina, 2020.
70 f. : il.

Orientador: Maria Isabel Mello Martins.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Sêmen - Tese. 2. Touros - Tese. 3. Sistema CASA - Tese. 4. IATF - Tese. I. Martins, Maria Isabel Mello. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

MYRIAN MEGUMY TSUNOKAWA HIDALGO

**RELAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS EM
TOUROS NELORES E ANGUS COM TAXA DE
GESTAÇÃO NA IATF**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Mello Martins
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Prof. Dr. Fábio Morato Monteiro
Instituto de Zootecnia de Sertãozinho- APTA

Londrina, 20 de fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho

Ao meu pai **João Bastart Hidalgo,**

À minha mãe **Yurie Tsunokawa Hidalgo.**

Pelo apoio e amor incondicional, pelas sábias palavras em todos os momentos da minha vida e por todas as orações ao meu favor.

AGRADECIMENTOS

Sobretudo à DEUS, que me dá forças, que me ilumina e que me faz acreditar que tudo é possível àquele que crê.

Aos meus heróis, meus pais João Bastart Hidalgo e Yurie Tsunokawa Hidalgo, vocês sempre foram e serão minha grande inspiração, meus maiores espelhos. Obrigada por todo amor, carinho, força e por todo apoio que sempre me deram. Com vocês eu aprendi que a vida é difícil sim, é meio azeda às vezes, mas é possível fazer uma limonada suíça com ela.

Ao meu amor, Douglas Martins Cecconello, meu maior companheiro nestes 7 anos, entre graduação, residência e mestrado. Agradeço por ter sido meu ponto de equilíbrio, por me confortar nos momentos difíceis e por me acompanhar nas maiores alegrias, por deixar tudo mais fácil, intenso, colorido e inesquecível.

À minha ‘queridã’ orientadora Maria Isabel Mello Martins, à quem eu tenho grande admiração como professora, pesquisadora e como mulher. Obrigada por ter me acolhido desde o primeiro momento e ter acreditado em mim. Obrigada por ser também amiga e manter sempre a porta aberta para conversas, novas idéias, e as vezes até alguns desabafos (risos), pela orientação, ensinamentos, carinho, compreensão, por me estimular a querer sempre mais e a aproveitar cada oportunidade. Serei sempre grata.

Ao professor Thales, à quem eu tenho um grande respeito e admiração. Obrigada por toda orientação e pelos ensinamentos passados durante esses anos, pela paciência e por ter me dado oportunidades de crescer tanto no âmbito pessoal como profissional.

Ao Fábio Lucas Zito de Moraes. Obrigada pela amizade, parceria, e fornecimento do banco de dados dos touros. Com certeza sem você, não teríamos esse estudo. Nosso muito obrigada.

A toda equipe “topstar” do LARAA- Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida: em especial a “lady” Bia Marques e “diva” Jamile Haddad, obrigada por todo companheirismo, paciência e todos os ensinamentos a mim passados. Aos demais, Luiz Guilherme, Letícia, residentes da TAC, estagiários e também ao Carlão que uma vez orientado, pra sempre orientado, muito obrigada por

todo apoio e união do grupo, juntos sempre somos mais fortes.

Ao Rodrigo Marubayashi, pela análise das subpopulações, minha menina dos olhos da dissertação, pela sua disponibilidade em me ajudar, pelos ensinamentos e estímulo.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

"Peça à Deus que abençoe os seus planos, e eles darão certo."
(Provérbios 16:3)

..

HIDALGO, Myrian Megumy Tsunokawa. **Relação das subpopulações espermáticas em Touros Nelore e Angus com taxas de gestação na IATF**. 2020. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A predição do desempenho de touros na Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), pela avaliação seminal, não está completamente estabelecida. Este estudo, teve por objetivo caracterizar as diferenças nos atributos e subpopulações espermáticas de touros com menor e maior desempenho reprodutivo, baseado nas taxas de gestação, visando estabelecer um método preditivo de maior eficiência na IATF. Com base no histórico da estação de monta entre setembro de 2017 à março de 2018 de quatro propriedades, foram selecionados 24 touros, da raça Angus (N= 9) e Nelore (N=15) que apresentaram variações nas taxas de gestação, estabelecendo-se 2 grupos experimentais a partir da mediana (52,27%): sendo o grupo de menor fertilidade (MENOR), touros que apresentaram resultados no programa de IATF < 52,27% (min: 33,33 %; máx: 51,81%), e grupo de maior fertilidade (MAIOR), touros que apresentaram resultados de taxa de gestação superiores a 52,27% (min: 52,27%; máx: 69,64%). Foram analisadas uma partida de sêmen descongelado de cada touro, nas quais os atributos avaliados foram: cinética espermática pelo sistema CASA; morfologia e integridade de membrana plasmática pela coloração eosina/nigrosina, em microscópio óptico, e a caracterização das subpopulações espermáticas com o *software* EDIT/SORT (sistema CASA; Hamilton Thorne, Ivos 14.0, Beverly, MA, EUA) e estatística multivariada. Diferenças entre grupos (MENOR vs. MAIOR) foram estimadas pelo teste t, e considerado nível de significância < 5%. O grupo MAIOR apresentou valores superiores para integridade de membrana (MENOR: 78,83% vs. MAIOR: 83,25%; p= 0,039), no entanto, para morfologia espermática não houve diferença entre os grupos: defeitos maiores (MENOR: 6,75% vs. MAIOR: 5,91%; p= 0,620), defeitos menores (MENOR: 12,25% vs. MAIOR: 12,08%; p= 0,954) e defeitos totais (MENOR: 19% vs. MAIOR: 17,91%; p= 0,743). Na análise de cinética espermática, foram encontradas diferenças entre os grupos, no qual, no grupo MAIOR foram identificadas maiores porcentagens (%) para: motilidade total (MENOR: 51,50% vs. MAIOR: 73,08%; p= 0,001); motilidade progressiva (MENOR: 29,33% vs. MAIOR: 32,33%; p= 0,007); células rápidas (RAPID; MENOR: 43,08% vs. MAIOR: 57,83%; p=0,002) e células com velocidade média (MEDIUM; MENOR: 8,5% vs. MAIOR: 15,41%; p=0,006) em contrapartida, o grupo MENOR apresentou maiores proporções de células estáticas (STATIC; MENOR: 27,33% vs. MAIOR: 6,41%; p= 0,001). Com base nos resultados de cinética foram caracterizadas estatisticamente quatro subpopulações espermáticas: 1-Rápidos e progressivos; 2- Lentos e progressivos; 3- Hiperativados; 4- Lentos e sinuosos. Sendo que touros com maior desempenho (MAIOR) apresentaram maior percentual de subpopulação 3 (34,45%), e no grupo de menor fertilidade (MENOR) maior percentual da subpopulação 2 (42,29%). Com isto, demonstra-se ser possível diferenciar touros de menor e maior desempenho na IATF, pelo estudo das subpopulações espermáticas constituindo-se, como um método efetivo para a predição do desempenho na biotecnologia da IATF.

Palavras-chave: fertilidade; touros; sêmen; sistema CASA; IATF.

HIDALGO, Myrian Megumy Tsunokawa. **Relationship of sperm subpopulations in Bulls Nelore and Angus with pregnancy rates in IATF**. 2020. 70 p. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

The prediction of bull performance in Fixed Time Artificial Insemination (FTAI), by seminal evaluation, is not fully established. This study aimed to characterize the differences in sperm attributes and subpopulations of bulls with minor and major reproductive performance, based on pregnancy rates, aiming to establish a more efficient predictive method in IATF. Based on the history of the breeding season between September 2017 and March 2018 of four farms, 24 bulls were selected, Angus (N = 9) and Nelore (N = 15), which showed variations in pregnancy rates, establishing 2 experimental groups from the median (52,27%): the group with minor pregnancy rate (MINOR), bulls that presented results in the IATF program <52.27% (min: 33.33%; max: 51.81%), and group of high pregnancy rate (MAJOR), bulls that presented results of pregnancy rate above 52.27% (min: 52.27%; max: 69.64%). A dose of frozen semen from each bull was analyzed, in which the attributes evaluated were: sperm kinetics by the CASA system; plasma membrane morphology and integrity by eosin / nigrosine staining, under an optical microscope, and the characterization of sperm subpopulations with the EDIT / SORT software (CASA system; Hamilton Thorne, Ivos 14.0, Beverly, MA, USA) and multivariate statistics. Differences between groups (MINOR vs. MAJOR) were estimated by the t-test, and the significance level <5% was considered. The MAJOR group showed higher values for membrane integrity (MINOR: 78.83% vs. MAJOR: 83.25%; p = 0.039), however, for sperm morphology there was no difference between the groups: major defects (MINOR: 6,75% vs. MAJOR: 5.91%; p = 0.620), minor defects (MINOR: 12.25% vs. MAJOR: 12.08%; p = 0.954) and total defects (MINOR: 19% vs. MAJOR: 17.91%; p = 0.743). In the analysis of sperm kinetics, differences were found between the groups, in which, in the MAJOR group, higher percentages (%) were identified for: total motility (MINOR: 51.50% vs. MAJOR: 73.08%; p = 0.001); progressive motility (MINOR: 29.33% vs. MAJOR: 32.33%; p = 0.007); fast cells (RAPID; MINOR: 43.08% vs. MAJOR: 57.83%; p = 0.002) and cells with medium speed (MEDIUM; MINOR: 8.5% vs. MAJOR: 15.41%; p = 0.006) in contrast, the MINOR group had higher proportions of static cells (STATIC; MINOR: 27.33% vs. MAJOR: 6.41%; p = 0.001). Based on the kinetics results, four sperm subpopulations were statistically characterized: 1-Fast and progressive; 2-Slow and progressive; 3- Hyperactivated; 4- Slow and winding. Major performance bulls (MAJOR) had the highest percentage of subpopulation 3 (34.45%), and in the minor fertility group (MINOR) the highest percentage of subpopulation 2 (42.29%). This shows that it is possible to differentiate bulls with minor and major fertility in the FTAI, by the study of sperm subpopulations, constituting itself as an effective method for predicting performance in FTAI biotechnology.

Keywords: fertility.;bulls; sêmen; CASA system; FTAI.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO

- Figura 1** – Dendrograma obtido pela análise de sêmen descongelado de touros Nelore e Angus, utilizando os parâmetros cinéticos espermáticos extraídos do *software* EDIT/ SORT do sistema CASA, resumizando a existência de três componentes principais (PC1; PC2 e PC3)64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Parâmetros cinéticos espermáticos avaliados pelo sistema CASA	25
---	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Parâmetros de concentração, morfologia espermática e integridade de membrana plasmática de partidas de sêmen descongeladas de touros Nelore e Angus avaliados em microscopia óptica, agrupadas por grupos de maior (MAIOR) e menor (MENOR) fertilidade (média \pm erro padrão).....64
- Tabela 2** – Parâmetros de cinética espermática de partidas de sêmen descongeladas de touros Nelore e Angus avaliados pelo sistema CASA, agrupadas por grupos de maior (MAIOR) e menor (MENOR) fertilidade (média \pm erro padrão)65
- Tabela 3** – Caracterização das subpopulações baseado nos movimentos e parâmetros cinéticos espermáticos66
- Tabela 4** – Número (n) e percentual de espermatozoides (%) distribuídos em cada subpopulação (total de 16,484 espermatozoides) e parâmetros de cinética espermática, determinados pelo sistema CASA e *software* EDIT/SORT, que caracterizam as subpopulações espermáticas de touros Nelore e Angus, com menor fertilidade (MENOR) após a descongelação67
- Tabela 5** – Número (n) e percentual de espermatozoides (%) distribuídos em cada subpopulação (total de 22,346 espermatozoides) e parâmetros de cinética espermática, determinados pelo sistema CASA e *software* EDIT/SORT, que caracterizam as subpopulações espermáticas de touros Nelore e Angus, com maior fertilidade (MAIOR) após a descongelação67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
BCF	Frequência de batimento flagelar cruzado
CASA	<i>Computer-assisted sperm analysis</i>
CEUA	Comitê de ética de uso de animais
DANCE	Relação VCL X ALH
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
LARAA	Laboratório de andrologia e reprodução animal assistida
LIN	Linearidade
MAIOR	Grupo de maior fertilidade
MEDIUM	Células com velocidade média
MENOR	Grupo de menor fertilidade
MT	Motilidade Total
MP	Motilidade Progressiva
SLOW	Células com velocidade lenta
STATIC	Células estáticas
STR	Retilinearidade
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VAP	Velocidade média do trajeto
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade progressiva
WOBBLE	Taxa de oscilação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	17
2.1	BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO	17
2.1.1	Inseminação Artificial em Tempo Fixo.....	17
2.1.2	Criopreservação e Análise do Sêmen Bovino.....	19
2.2	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO SÊMEN	22
2.2.1	Microscopia Óptica	22
2.2.2	Análise Computadorizada do Sêmen	24
2.2.2.1	Subpopulações espermáticas.....	27
3	REFERÊNCIAS	31
4	HIPÓTESE	43
5.	OBJETIVOS	44
5.1	OBJETIVO GERAL	44
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
6	ARTIGO – RELAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS EM TOUROS NELORE E ANGUS COM TAXAS DE GESTAÇÃO NA IATF	45
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68

1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018), o rebanho brasileiro de bovinos conta com aproximadamente 221 milhões de animais, sendo o maior rebanho do mundo. Esse crescimento é devido a nutrição e a utilização cada vez maior de biotécnicas da reprodução, tais como a inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embriões (TE) (ABIEC, 2018). Das biotécnicas reprodutivas utilizadas, a IATF se destaca, pois sem a necessidade de detecção de cio, fornece uma abordagem organizada para incrementar o uso da inseminação artificial (IA) e melhorar a eficiência reprodutiva em rebanhos de corte (SÁ FILHO et al., 2010).

Apesar dos avanços na produção de gado de corte e leite demonstrados pelo desenvolvimento comercial da IATF, existem diversos protocolos hormonais que resultam taxas de prenhez em vacas ao redor de 50 a 60% (CUTAIA et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004) assim como, já foram descritos taxas de prenhez entre 40 a 50% (NOGUEIRA et al., 2019). Diversas variáveis podem estar relacionados a esses resultados, como fatores inerentes à fêmea, como o anestro pós-parto e a baixa condição corporal no início dos protocolos, além de fatores pertencentes à qualidade do sêmen utilizado nos programas, tais como os padrões de cinética espermática, integridade de membrana plasmática e dose inseminante utilizada (NOGUEIRA et al., 2019).

Neste contexto, a fertilidade do macho passou a ter um impacto ainda maior no desempenho reprodutivo dos rebanhos, devido à intensa utilização de um único reprodutor no acasalamento de diversas fêmeas (ARRUDA et al., 2010; KATHIRAVAN et al., 2011). Além disso, para a eficiência reprodutiva, é primordial conhecer a fertilidade e a capacidade de congelação do sêmen do animal escolhido (FRASER, 2017). A avaliação da fertilidade dos reprodutores baseia-se principalmente na análise do sêmen após a descongelação usando parâmetros convencionais, como motilidade espermática, morfologia, viabilidade, integridade de membrana plasmática e acrossoma (KATHIRAVAN et al., 2008). Para alcançar bons índices de fertilidade, foram realizados grandes avanços quanto à criopreservação e procedimentos de controle de qualidade do sêmen de touros (VICENT et al., 2014).

Rotineiramente, os parâmetros espermáticos como concentração,

morfologia e motilidade espermática antes e após à descongelação, têm sido avaliadas de forma subjetiva usando um microscópio de luz, e de fato os defeitos morfológicos oriundos de alterações durante a espermatogênese, podem interferir na função espermática e na fertilidade (BARTH; OKO, 1989; MORRELL et al., 2008). Embora estas avaliações ainda sejam de grande importância para a análise clínica de rotina, existem muitos outros fatores capazes de afetar a fertilidade e que são passíveis de serem avaliados por métodos mais sensíveis e eficientes (GRAHAM, 2001; HAMILTON et al., 2016).

Com o propósito da obtenção de uma técnica de maior repetibilidade, a análise computadorizada de sêmen (sistema CASA) representa um método objetivo que gera informações importantes a respeito das características cinéticas de um ejaculado baseando-se na avaliação individual das células (BROEKHUIJSE et al., 2011; AMANN; WABERSKI, 2014), o que permite a identificação de diferentes subpopulações espermáticas em uma amostra com características similares (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). Estudos evidenciam que a caracterização das subpopulações espermáticas podem ser indicadores da qualidade do sêmen, considerando que espermatozoides com movimentos rápidos e lineares têm maior resistência à criopreservação e maior probabilidade de fertilizar o oócito (MENDOZA et al., 2012; FERRAZ et al., 2014). A identificação das subpopulações ainda se faz relevante para selecionar os machos que possuem maior porcentagem de subpopulações superiores, resistentes a criopreservação e que se adaptem melhor às biotécnicas (MARTINS; SOUZA; TRAUTWEIN, 2017). Além disso, quando os padrões de movimento espermático foram correlacionados com os índices de fertilidade *in vivo*, observaram diferenças significativas no padrão de movimento desempenhado por espermatozoides que alcançam altas e baixas taxas de fertilização (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

Além destes, outros parâmetros morfofuncionais do sêmen foram estudados, a fim de investigarem seus valores preditivos. Por exemplo, a integridade de membrana, devido ao seu papel na fertilização, foi considerada como um marcador significativo para a capacidade fecundante (THOMAS et al., 1997; FLESCHE; GADELLA, 2000). Assim como o acrossoma, que precisa estar intacto para que ocorra a indução da reação acrossômica e a fertilização seja bem sucedida (ÔURA; TOSHIMORI, 1990).

O método mais representativo para avaliar o potencial fecundante do

sêmen é pelos resultados obtidos da fertilidade *in vivo*. No entanto, é difícil aplicar este método na rotina pelo custo e tempo requerido (AL NAIB et al., 2011; MORADO et al., 2015). A fertilidade do macho está intrinsecamente ligada à qualidade do sêmen, porém, o método de predição da fertilidade de uma amostra seminal *in vitro* não é simples, sendo que diferentes características do sêmen podem limitar o potencial fecundante (AMANN, 1989). Fatores dependentes do indivíduo, do próprio espermatozoide, de como o sêmen foi processado e de como a amostra foi avaliada podem influenciar na predição da fertilidade do sêmen (AMANN; HAMMERSTEDT, 1993; VINCENT et al., 2014). Desta forma, estimativas ou predições do potencial de fertilidade do sêmen tem sido um desafio, principalmente pela heterogeneidade do ejaculado, devido à presença de distintas subpopulações com diferentes características funcionais dentro do ejaculado, que podem interferir no processo de fecundação (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2006).

Considerando que na literatura são escassos os estudos que avaliem a influência das características cinéticas, incluindo as subpopulações, com os resultados da IATF, a presente proposta teve como principal objetivo identificar e caracterizar as subpopulações espermáticas do sêmen de touros e buscar associação entre as subpopulações espermáticas e a taxa de gestação na IATF.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO

2.1.1 Inseminação Artificial em Tempo fixo (IATF)

A biotecnologia da reprodução é utilizada como recurso para acelerar a produção, aumentar a eficiência reprodutiva, além de promover o melhoramento genético do rebanho. Atualmente o Brasil se destaca por ser o quinto maior país em extensão territorial e possuir o maior rebanho bovino comercial do mundo com aproximadamente 221 milhões de cabeças (IBGE, 2018). O incremento nos índices reprodutivos e conseqüentemente rentabilidade na produção, pode ser alcançado com o uso de biotécnicas, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que elimina a necessidade de detecção de estro e possibilita um maior número de animais inseminados em tempo reduzido (SANTOS; TORTORELLA; FAUSTO, 2018). Em 2018, o mercado nacional de inseminação artificial (IA) chegou a 15,4 milhões de doses de sêmen comercializadas (ASBIA, 2019). Esse aumento do mercado de IA no Brasil ocorreu simultaneamente com introdução da tecnologia de IATF nas fazendas. Com base nos dados estatísticos, o número de IATF no Brasil alcançou 13,3 milhões de procedimentos, indicando que 86% das inseminações foram realizadas por IATF, gerando aproximadamente R\$3,5 bilhões de ganhos para a pecuária brasileira. Além destes impactos econômicos diretos, estas informações evidenciam a consolidação da tecnologia e perspectivas positivas para o mercado bovino (BARUSELLI et al., 2019).

Nesse contexto, torna-se fundamental aprimorar e desenvolver estratégias reprodutivas que contribuam com o aumento dos índices reprodutivos e redução do intervalo entre inseminações, sem comprometer a viabilidade da gestação estabelecida (SÁ FILHO et al., 2014; BARUSELLI et al., 2019). Sendo assim, foram desenvolvidos protocolos de ressincronização da ovulação para as fêmeas que não se tornaram gestantes. Esses programas reprodutivos, permitem que após a identificação rápida das vacas não prenhes na IATF anterior, as fêmeas sejam inseminadas novamente, aumentando a proporção de vacas gestantes por IA

(BARUSELLI et al., 2017).

A ressincronização convencional é iniciada no momento do diagnóstico de gestação, cerca de 28 a 32 dias após a IATF (MARQUES et al, 2012; STEVENSON et al., 2003), esse método possibilita realizar três inseminações com intervalo de 80 dias. Posteriormente, foi desenvolvida a ressincronização precoce, a qual é iniciada em todas as fêmeas do lote, independentemente do diagnóstico de gestação, 22 dias após a IATF. No dia 30 todas as fêmeas são submetidas a diagnóstico de gestação e somente as vazias seguem no protocolo de IATF, este método permite realizar três inseminações com intervalo de 64 dias (SÁ FILHO et al., 2014), Recentemente, foi desenvolvida a ressincronização super precoce, a qual tem início em todas as fêmeas 14 dias após a IATF e é possível realizar três inseminações em 48 dias. No dia 22, todas as fêmeas vazias são diagnosticadas através da ultrassonografia Doppler (VIEIRA et al., 2014), analisando-se a presença e o fluxo vascular do CL (SIQUEIRA et al., 2013; PUGLIESI et al., 2017).

Contudo, apesar dos avanços na produção de gado de corte e leite demonstrados pelo desenvolvimento comercial da IATF, existem diferentes protocolos hormonais que resultam taxas de prenhez em vacas ao redor de 50 a 60% (CUTAIA et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004) assim como, já foram descritos resultados abaixo dessa média, que variaram entre 40 a 50% (NOGUEIRA et al., 2019). Diversos fatores podem estar correlacionados com o sucesso nos protocolos de IATF, como os fatores inerentes à fisiologia da fêmea: escore de condição corporal (ECC), raça animal, categoria de animais (novilhas ou vacas, primíparas ou multíparas), amamentação, tamanho do folículo ovulatório, momento da inseminação em relação à ovulação e eficiência do protocolo de sincronização; característica da fazenda e o inseminador (SÁ FILHO et al., 2009; OLIVEIRA, 2012), a qualidade do sêmen do touro utilizado é um dos fatores cruciais para a eficiência dos programas reprodutivos. O uso de sêmen de baixa qualidade pode interferir negativamente, sobre a resposta reprodutiva de um programa, inviabilizando todos os esforços empreendidos e investidos na propriedade (SEVERO, 2009).

A avaliação da fertilidade dos reprodutores baseia-se principalmente na análise do sêmen após a descongelação usando parâmetros convencionais, como motilidade espermática, morfologia, viabilidade, integridade de membrana e acrossoma (KATHIRAVAN et al., 2008). Alguns autores demonstraram que o sêmen utilizado na IATF tem grande impacto sobre a taxa de prenhez (OLIVEIRA et al., 2013,

2014; NOGUEIRA et al., 2014). A diminuição da fertilidade é uma condição multifatorial, portanto, muito difícil de diagnosticar. Touros podem ter baixa fertilidade, mesmo quando as características reprodutivas clássicas estão normais (MISHRA et al., 2013), demonstrando que a fertilidade varia substancialmente entre os touros. Touros de baixa e alta fertilidade podem não apresentar diferenças nas avaliações convencionais em termos de concentração espermática e motilidade progressiva, apresentando melhor correlação com fertilidade quando realizados testes funcionais (CORREA; PACE; ZAVOS, 1997). Assim, avaliações convencionais não determinam a capacidade do espermatozoide de interagir com o oócito, fecundar e desenvolver o embrião (BERLINGUER et al., 2009; LI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014; VINCENT et al., 2014). Embora os espermatozoides possam sobreviver ao processo de criopreservação e apresentar boa motilidade eles podem não ter potencial de fertilidade. Essa subfertilidade é consequência de várias mudanças funcionais induzidas pela criopreservação (WATSON, 1995). Deve considerar-se também, que um ejaculado de touro que contém entre 800 milhões a 2 bilhões de espermatozoides/mL apresenta uma população heterogênea de células de diferentes qualidades e só alguns poucos espermatozoides contém as características necessárias para garantir a fertilidade (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2017).

Diante disto, os avanços em avaliações estruturais e funcionais dos espermatozoides têm sido cruciais para excluir amostras de sêmen de baixa qualidade, contudo, apontar dentre os animais quais os mais aptos a proporcionar as maiores taxas de prenhez, ainda é um grande desafio. Portanto, obter resultados com uma associação de diferentes avaliações espermáticas e desta forma utilizá-los na pré-seleção de animais de alta fertilidade, possibilitaria obter melhores índices na taxa de prenhez (ARRUDA et al., 2010).

2.1.2 Criopreservação e Análise do Sêmen Bovino

A utilização do sêmen bovino congelado representa a principal biotécnica reprodutiva para o melhoramento genético animal (FREITAS-DELL' AQUA et al., 2009). Entretanto, nem todas as células espermáticas têm a capacidade de serem criopreservadas, pois o procedimento prejudica a fisiologia espermática e conseqüentemente sua sobrevivência (EL- HARAIRY et al., 2011; AVDATEK et al.,

2018).

O processo de criopreservação pode causar danos aos espermatozoides, que refletem em decréscimo de aproximadamente 50% da motilidade espermática (THOMAS et al., 1997; CELEGHINI et al., 2007) e quando considerada a integridade das membranas espermáticas esta queda pode ser mais acentuada, chegando a mais de 60% (CELEGHINI et al., 2007). A relação da qualidade do sêmen com a fertilidade é um dos pontos cruciais dentro do sistema de produção (JANUŠKAUSKAS; ŽILINSKAS, 2002). Neste contexto, toda a manipulação e congelação do sêmen é de extrema importância, pois qualquer erro no processamento do sêmen pode ocasionar danos morfofuncionais às células, e assim prejudicar a fecundação do oócito após a inseminação, reduzindo os índices de prenhez (NTEMKA et al., 2016).

O intuito da criopreservação é manter a motilidade inicial dos espermatozoides, e para isto é necessário que os diluentes possuam uma fonte nutritiva às células, com açúcares como glicose, frutose ou lactose, proteção das proteínas da membrana espermática, proveniente de gema de ovos ou lecitina de soja, por exemplo; antibióticos, para impedir a multiplicação de microorganismos; soluções tampão, para manutenção de pH ideal; antioxidantes para minimizar os níveis de espécies reativas a oxigênio (ROS); e crioprotetores, os quais tem o intuito de prevenir a formação de cristais de gelo dentro das células, o que poderia danificar a integridade física dos espermatozoides (EL- HARAIRY et al., 2011; RAHEJA et al., 2018).

Embora sejam notáveis os efeitos negativos sobre os espermatozoides após a descongelação, como queda na motilidade decorrente de alterações na função mitocondrial, lesão em membrana plasmática e acrossoma (LAYEK et al., 2016; NTEMKA et al., 2016), a criopreservação de espermatozoides tem a vantagem do armazenamento por períodos indefinidos e proporcionar a distribuição mundial (LAYEK et al., 2016).

O sucesso reprodutivo depende da eficiência de várias funções espermáticas. Desta forma, a avaliação do potencial de fertilidade de uma amostra de sêmen congelado é de grande importância para o emprego de técnicas reprodutivas (GARCÍA-ÁLVAREZ, 2009). Apesar dos avanços quanto ao conhecimento da fisiologia reprodutiva do macho, a aplicação de métodos preditivos de fertilidade não é amplamente satisfatória, provavelmente devido à grande

complexidade da célula espermática, que requer diferentes atributos para ser capaz de fecundar o oócito (GRAHAM, 2001; GRAHAM; MOCÉ, 2005) e da possibilidade de existirem atributos para a fecundação que ainda não são bem conhecidos (GRAHAM; MOCÉ, 2005; SELLEN et al., 2015). Por isso, considera-se que nenhum teste isolado é capaz de estimar a fertilidade de uma amostra de sêmen, mas a investigação de várias características pode determinar maior potencial de fertilidade (ARRUDA et al., 2011).

Dentre os principais testes de análise espermática utilizados pode-se destacar: análise subjetiva da motilidade, análise computadorizada do movimento espermático e morfologia e análise morfofuncional por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo (FREITAS-DELL' AQUA et al., 2009). Portanto, é crucial implementar um sistema de predição de fertilidade, baseado na avaliação de vários parâmetros de qualidade do sêmen após congelação e descongelação, para excluir touros de baixo potencial de fertilidade de programas de melhoramento, economizando tempo e recursos econômicos consideráveis (NTEMKA et al., 2016).

2.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO SÊMEN BOVINO

2.2.1 Microscopia Óptica

Os métodos de avaliação utilizados em centrais de coleta e processamento de sêmen consistem basicamente em análise subjetiva da motilidade (antes e após estresse térmico), concentração, morfologia e integridade das membranas plasmática e acrossomal (CRESPILHO et al., 2009). Uma das primeiras técnicas a serem utilizadas na avaliação do sêmen foi a morfologia espermática, técnica até hoje sem grandes modificações. O parâmetro morfológico do ejaculado é uma parte essencial na avaliação espermática (MORTIMER; MENKVELD, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). É uma abordagem melhor que a motilidade para avaliar as características genéticas e de DNA da célula (RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, 2006; MENKVELD; HOLLEBOOM; RHEMREV, 2011).

Como apenas os espermatozoides viáveis são capazes de interagir com o oócito e iniciar o processo de fecundação (WALTERS ET AL., 2004), sabe-se

que os defeitos específicos na morfologia estrutural das células espermáticas correlacionam-se com a sub e a infertilidade dos machos (SAACKE et al., 1999; PESH; BERGMANN, 2006). Desta forma, a análise da morfologia espermática permite a identificação de touros com baixo potencial de fertilidade, evitando a introdução desses animais nos programas de congelação de sêmen (JANUŠKAUSKAS; ŽILINSKAS, 2002).

A avaliação da morfologia espermática pode ser realizada por diferentes técnicas laboratoriais: esfregaços corados por Wright, Rosa de Bengala, Giemsa, eosina-nigrosina, Karras e outros (ARRUDA et al., 2011) avaliados em microscópio óptico de campo claro e preparação úmida por microscópio de contraste de fase e por contraste de interferência diferencial (DIC). A estimativa de alterações morfológicas deve ser realizada em 200 células, apesar de já ter sido relatado que a leitura de 100 células se mostraram confiáveis e suficientes para representar a amostra do ejaculado (HIDALGO et al., 2005; 2006), contando-se células normais e células anormais, sendo que deve ser considerado apenas um defeito por célula. Se forem observados dois ou mais defeitos na mesma célula, devem ser registrados em ordem de prioridade, o defeito maior em relação ao menor e, se observados dois defeitos de mesma classificação, registra-se apenas o de maior frequência (FRENEAU, 2011).

As alterações morfológicas dos espermatozoides podem ser classificadas com base na origem da alteração em defeitos primários, que ocorrem durante a espermatogênese, no testículo; defeitos secundários, causados durante a maturação espermática, no epidídimo, e defeitos terciários, que ocorrem após a liberação do espermatozoide (SEVERO, 2009). Entretanto, a classificação binária dos defeitos em maiores ou menores é a mais empregada, sendo os defeitos maiores mais relacionados com infertilidade e doenças testiculares ou epididimárias, enquanto os defeitos menores são referentes a anomalias de menor impacto na fertilidade. Para a interpretação do resultado do espermograma, devem ser considerados os percentuais de defeitos maiores, menores e defeitos totais (CBRA, 2013).

Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) é recomendado para ejaculados de touros os seguintes padrões: espermatozoides morfolologicamente normais - valor mínimo de 70% de células normais, esta é a característica isolada que tem maior importância para a fertilidade do touro no rebanho; defeitos maiores - o valor máximo de tolerância de até 10%, o rigor ou

tolerância na interpretação dessa característica deve levar em consideração o quadro clínico e espermático do animal e inclusive a distribuição dos defeitos individuais; defeitos menores - o valor máximo de tolerância de até 20%, respeitado o limite de 70% de normais e, inclusive, a distribuição dos defeitos individuais; defeitos individuais - sugere-se que os limites individuais de anormalidades sejam de até 5% para defeitos maiores e 10% para defeitos menores. Para utilização do sêmen bovino congelado (Convencional): a) volume da dose 0,25 ou 0,5 mL; b) Motilidade progressiva $\geq 30\%$; c) Vigor ≥ 3 ; d) para doses com 10×10^6 de espermatozoides com motilidade progressiva: espermatozoides normais $\geq 70\%$ e tolerância de defeitos maiores $\leq 10\%$.

Foram reportados estudos sobre a avaliação andrológica de touros, os quais demonstraram que, de todas as características aferidas nos touros, a morfologia espermática foi a que teve maior repetibilidade e relação com a produção de bezerros/touro na estação reprodutiva, comprovada pela paternidade dos touros por meio da análise de DNA dos animais (FITZPATRICK et al., 2002; HOLROYD et al., 2002). Nos trabalhos realizados por Phillips et al. (2004), na tentativa de prever os índices de fertilidade em machos taurinos utilizando dose de sêmen congelada, isoladamente apenas morfologia espermática pós-descongelção apresentou correlação significativa com a taxa após inseminação artificial. Sugerindo assim, que os melhores parâmetros preditivos encontrados foram derivados dos resultados referentes à morfologia espermática, permitindo, a identificação dos touros com maior ou menor potencial de fertilidade.

Da mesma forma, Enciso et al. (2011) descreveram relação entre espermatozoides de touros da raça holandês morfologicamente anormais e baixa qualidade do DNA, apontando que grandes anormalidades espermáticas, parecem estar intimamente associadas à presença de DNA danificado.

Assim como a morfologia espermática, outro parâmetro a ser considerado na avaliação da fertilidade do macho, ou na análise dos métodos de preservação espermática, é o estudo da viabilidade do espermatozoide (PINTADO; FUENTE; ROLDAN, 2000). A membrana plasmática tem importante papel em diversos eventos fisiológicos da função espermática, sendo responsável pela preservação da homeostase celular (ANDRADE et al., 2007), participando dos processos de capacitação (HALLAP et al., 2006), da apoptose celular (DURU et al., 2001; MARTIN et al., 2004) e da fecundação, ao interagir com epitélio do trato reprodutivo feminino e com as células do complexo *cumulus oophorus* (HOSSAIN et

al., 2011). Desta forma, a avaliação da integridade de membrana é considerada como reflexo da viabilidade celular, por estar envolvida diretamente com a capacidade fecundante do espermatozoide (HALLAP et al., 2006; NARESH; ATREJA, 2015).

A avaliação da integridade de membrana plasmática pode ser realizada com o uso de: sondas fluorescentes impermeáveis a membrana íntegra, mas que na presença de lesões, adentram a célula e se ligam ao DNA, permitindo a identificação de espermatozoides com alterações (PEÑA; JOHANNISSON; WALLGREN, 2003), teste hiposmótico (ARRUDA et al., 2011) e a dupla coloração com eosina/nigrosina. A eosina é um corante supravital que não penetra em células com membrana plasmática intacta, mas, quando lesadas, liga-se aos ácidos nucléicos, no qual lhe confere uma coloração rosa. A nigrosina é responsável pelo contraste mais escuro de fundo da lâmina, o qual permite a visualização dos espermatozoides não corados. Portanto, este teste tem sido recomendado como uma avaliação adicional àquelas de rotina (BRITO, 2007).

Embora a identificação de espermatozoides portadores de defeitos na morfologia e membrana plasmática seja possível por meio de microscopia óptica, a observação de outros elementos morfofuncionais, como a cinética espermática, requer o emprego de métodos mais objetivos, como o sistema CASA, que podem correlacionar com mais acurácia esses parâmetros de fertilidade.

2.2.2 Análise Computadorizada do Sêmen (sistema CASA)

A análise da motilidade e morfologia espermática têm sido apontadas por muitos autores como importante ferramenta na seleção de um ejaculado, sendo a determinação da porcentagem de espermatozoides móveis, o teste mais utilizado para prever a qualidade seminal. Desta forma, a quantificação da qualidade espermática, rotineiramente, tem sido baseada na avaliação subjetiva, usando estimativa visual de parâmetros como motilidade geral e individual, porém, estudos relatam uma variação de até 60% na estimativa desses parâmetros devido à limitação do técnico em quantificar as diferentes subpopulações espermáticas na amostra (VERSTEGEN et al., 2002). Para reduzir a subjetividade na avaliação da motilidade espermática em microscopia óptica, adotou-se o uso da análise computadorizada de sêmen (sistema CASA) para avaliação de parâmetros cinéticos de espermatozoides e obtenção de

dados das subpopulações na amostra (KATHIRAVAN et al., 2011; BERGSTEIN et al., 2014; SIMONIK et al., 2015; MARTINS; SOUZA; TRAUTWEIN, 2017; SOUZA et al., 2018).

O sistema CASA trata-se de uma câmera e um computador acoplados à um microscópio com contraste de fase, fornecendo imagens em tempo real da movimentação dos espermatozoides (KATHIRAVAN et al., 2011). Este *software* reconstrói a trajetória de cada célula devido ao conjunto de imagens digitais captadas por segundo em diversos campos de observação, classificando-a conforme os padrões definidos em: móvel, lenta, rápida e estática. Em seguida, uma série de outras características de movimento espermático é calculada, fornecendo parâmetros como: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) e frequência de batimentos flagelares (BCF). Estes valores são usados para diferenciar os padrões do movimento espermático (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; KATHIRAVAN et al., 2011).

Os principais parâmetros analisados pelo sistema CASA estão expostos no Quadro 1.

Quadro 1 – Parâmetros cinéticos avaliados pelo sistema CASA.

Parâmetros do CASA	
MT- motilidade total (%)	Proporção de espermatozoides móveis
MP- motilidade progressiva (%)	Proporção de espermatozoides móveis com trajetória em linha reta
VAP- velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$)	Velocidade da trajetória média do espermatozoide
VSL –velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$).	Distância entre início e fim da trajetória dividida pelo tempo decorrido.
VCL –velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$).	Velocidade da trajetória do espermatozoide.
ALH –amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm)	Largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento
BCF –frequência de batimentos flagelares (Hz)	Frequência com que a linha da cabeça espermática atravessa a trajetória celular.

STR –retilinearidade (%)	Relação entre VSL e VAP
LIN – linearidade (%)	Razão entre VSL e VCL
WOB – oscilação	Relação entre VAP e VCL
DANCE-	Razão entre VCL x ALH

Fonte: Adaptado de Bergstein et al., 2014; Simonik et al., 2016

No entanto, vários fatores podem gerar variabilidade na estimativa dos parâmetros funcionais dos espermatozoides mensurados pelo sistema CASA, entre eles: experiência do observador, identificação da espécie, acurácia da câmara utilizada, temperatura de análise, tempo entre a colheita da amostra e sua análise, método de processamento da amostra, concentração espermática e frequência de aquisição de imagens. Além disso, é necessário a aplicação de um *setup* adequado à análise por espécie (MORTIMER, 2000; KATHIRAVAN et al., 2011).

Apesar do sistema CASA fornecer dados confiáveis sobre a motilidade dos espermatozoides, nota-se uma desvantagem. Devido a existência de inúmeros *softwares* para análise espermática, não há ainda uma padronização do *setup* e dos parâmetros avaliados, tornando-se menos acurada a comparação entre diferentes sistemas (KATHIRAVAN et al., 2011; LU; HUANG, 2014; SIMONIK et al., 2015).

A motilidade espermática sempre foi considerada o melhor critério para avaliar a qualidade de um ejaculado, ao tornar tal análise objetiva, sua acurácia aumentou (BERGSTEIN et al., 2014). Com isto, foram propostos estudos com intuito de correlacionar os parâmetros explorados pelo sistema CASA com a fertilidade de touros.

O sistema CASA tem mostrado ser uma técnica útil na avaliação cinética do espermatozoide de forma individual, mostrando grande potencial para prever a fertilidade do macho, por meio da correlação da velocidade do espermatozoide com a fertilização de oócito *in vitro* e *in vivo* (COX et al., 2006).

Em estudo feito por Verstegen et al. (2002) para correlacionar os parâmetros do sistema CASA com a taxa de fertilização, verificou-se que os valores de VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fertilizados do que naquelas onde a taxa de fertilização de oócito é menor que 50%. Amostras com elevados valores desses parâmetros de velocidade e de LIN e BCF apresentam melhor migração e penetração no muco cervical

(MORTIMER, 2000; VERSTEGEN et al., 2002), revelando uma correlação positiva entre BCF e LIN com a taxa de gestação em alguns estudos (SUAREZ; KATZ; OWEN, 1991; SUKCHAROEN et al., 1998), porém correlação negativas em outros (DONNELLY et al., 1998; 2000).

Ao avaliar cada parâmetro individualmente, Nagy et al. (2015), relataram que os valores de VAP tiveram uma relação positiva com a fertilidade de espermatozoides bovinos pós-descongelamento. Assim como, Inanç et al. (2018) que observaram altas correlações para VCL, VAP, VSL e ALH com taxas de gestação utilizando doses de sêmen bovino congeladas. Diferenças nos parâmetros da cinética espermática também foram descritos por Shojaei et al. (2012) na comparação entre touros de alta e baixa fertilidade, considerando a taxa de não retorno ao cio. Neste estudo, o sêmen descongelado de touros com alta fertilidade possuía valores superiores de ALH, motilidade total e progressiva. Em estudo realizado na utilização da avaliação de sêmen congelado de touros para a predição da fertilidade à campo, os parâmetros de motilidade total, BCF, VCL e ALH foram incluídos no modelo preditivo, explicando quase metade ($R^2 = 0,47$, $P < 0,05$) da variação na taxa de concepção (GLIOZZI et al., 2017).

No entanto, apesar do sistema CASA ser uma ferramenta amplamente utilizada em laboratórios e universidades, somente ele, não é suficiente para prever a fertilidade seminal. Mas ao ser associado com outras técnicas, se torna uma metodologia importante para avaliar a qualidade do sêmen (SIMONIK et al., 2015; GLIOZZI et al., 2017).

2.2.2.1 Subpopulações espermáticas

A falta de explicações acerca da diferença no potencial de fertilidade de uma partida de sêmen pode ser em função de atributos espermáticos não avaliados. A heterogeneidade da população espermática de um ejaculado pode justificar mudanças no potencial de fertilidade das partidas de sêmen, existindo diferença entre touros e entre ejaculados do mesmo touro. Além disso, no mesmo ejaculado existem populações com diferentes estruturas, formas e graus de funcionalidade (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2014). A categoria heterogênea do ejaculado é notada em diferentes aspectos, por exemplo, quando avaliada a

motilidade já foram relatadas subpopulações em relação às características de cinética celular (MUIÑO et al., 2008; 2009), demonstrando assim, enorme relevância funcional, principalmente com relação a fertilidade (YÁNIZ et al., 2016). Ademais, a distribuição de frequência de espermatozoides dentro de cada subpopulação após a criopreservação varia entre machos (RUBIO-GUILLÉN et al., 2007), demonstrando que alguns indivíduos são mais sensíveis a criopreservação, sendo um bom marcador do potencial de congelabilidade. O potencial de fertilidade do macho depende da heterogeneidade do ejaculado interagindo com o trato reprodutivo da fêmea em diferentes níveis (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2013, CURRY, 2000).

A determinação das subpopulações pode ser realizada por meio da morfometria espermática (SANTOLARIA et al., 2016; VALVERDE et al., 2016), entretanto, a avaliação individualizada pelas características de cinética espermática no sistema CASA, demonstrou ser o método mais fidedigno no estudo das subpopulações (LUNA et al., 2017). A partir dos parâmetros cinéticos, o sistema CASA é capaz de subdividir os espermatozoides em categorias pré-definidas e até mesmo subpopulações (BERGSTEIN et al., 2014), permitindo a obtenção de informações objetivas sobre as características cinéticas dos espermatozoides presentes no ejaculado (AMANN; WABERSKI, 2014). Na tentativa de identificar as subpopulações, trabalhos recentes utilizaram *softwares* específicos e procedimentos estatísticos multivariados para investigar melhor o ejaculado das espécies, fornecendo dados significativos sobre as características biológicas do espermatozoide e as alterações comparando espécies (FLORES et al., 2008; VICENTEFIEL et al., 2013), técnicas de colheita de sêmen (CONTRI et al., 2012; VÁZQUEZ et al., 2015) e mudanças nas características dessas células após a criopreservação (NÚÑEZ-MARTÍNEZ et al., 2006; MUIÑO et al., 2008; 2009; DORADO et al., 2011; BEIRÃO et al., 2011; PEÑA et al., 2012; FERRAZ et al., 2014; GALLEGO et al., 2017).

Nos últimos anos, foram relatados estudos em diferentes espécies animais, como gatos (GUTIÉRREZ-REINOSO; GARCÍA-HERREROS, 2016; SOUZA et al., 2018), cães (NÚÑEZ-MARTÍNEZ et al., 2006; PEÑA et al., 2012), garanhões (QUINTERO-MORENO et al., 2003), jumentos (FLORES et al., 2008), carneiros (DORADO et al., 2011; SANTOLARIA et al., 2015; BERGSTEIN-GALAN et al., 2017; BARBAS et al., 2018), javalis (QUINTERO-MORENO et al., 2003; FLORES et al., 2009; ESTRADA et al., 2017), coelhos (QUINTERO-MORENO et al., 2007), veados (MARTINEZ-PASTOR et al., 2005), entre outros. Em bovinos, estudos com sêmen

fresco e amostras descongeladas, identificaram quatro subpopulações de espermatozoides (MUIÑO et al., 2008; 2009; FERRAZ et al., 2014), sendo elas: (1) de baixa velocidade e alta progressividade; (2) alta motilidade, mas sem progressividade dos espermatozoides; (3) células com baixa motilidade e sem movimento progressivo; (4) composta por espermatozoides rápidos com movimentos progressivos.

Desta forma, estudos correlacionaram espermatozoides pertencentes ao cluster 4, com sua melhor capacidade de congelação e também com melhores índices de fertilização (FERRAZ et al., 2014). Considerando a fertilidade à campo, similarmente, em garanhões (QUINTERO-MORENO et al., 2003) e carneiros (YÁNIZ et al., 2015), foram relatados que em amostras de machos que resultaram em maior taxa de gestação, apresentaram maior percentual de espermatozoides na subpopulação com característica de cinética rápida e progressiva e baixa linearidade. Del Olmo et al. (2013), por sua vez, relataram que, na espécie ovina, a determinação das subpopulações espermáticas pelo sistema CASA foi eficaz para identificar amostras de sêmen congelado que, quando utilizados em inseminação artificial, apresentaram resultados de maiores taxas de nascimento de cordeiros.

Embora a origem e a fisiologia dessas subpopulações não sejam claras, acredita-se que a diferença das células ocorra por influência genética durante a espermatogênese, e modificação da estrutura durante maturação, uma vez que há a presença de espermatozoides com idades diferentes no epidídimo e conseqüentemente no ejaculado, gerando diferentes padrões de movimento (ABAIGAR et al., 1999; MARTINEZ-PASTOR et al., 2008; KATHIRAVAN et al., 2011).

Desta forma, levando em consideração as subpopulações que estão presentes em um ejaculado, tem-se informações relevantes a respeito da diversidade funcional dos grupos de espermatozoides (YANIZ et al., 2018), proporcionando uma análise mais acurada do que as análises que utilizam valores médios, pois valores médios destes parâmetros, tende a ocultar o significado da diversidade da cinética dos diferentes espermatozoides dentro de uma amostra seminal (HOLT; O'BRIEN; ABAIGAR, 2007; AMANN; WABERSKI, 2014). Além disso, a caracterização das subpopulações permite evidenciar diferenças entre os grupos experimentais, entre diferentes tratamentos, nos quais muito dos efeitos ainda são desconhecidos (MUIÑO et al., 2008; KATHIRAVAN et al., 2011; AMANN; WABERSKI, 2014) ou até utilizar na predição do desempenho reprodutivo (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN,

2002; KATHIRAVAN et al., 2011).

Considerando que na literatura são escassos os estudos que avaliem a influência das características cinéticas, incluindo as subpopulações, por meio do sistema CASA, com os resultados de programas reprodutivos, o presente trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar as subpopulações espermáticas do sêmen de touros Nelore e Angus e buscar a relação das subpopulações espermáticas com a menor e maior fertilidade de touros utilizados na IATF.

3 REFERÊNCIAS

- AL NAIB, A.; HANRAHAN, J. P.; LONERGAN, P.; FAIR, S. *In vitro* assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 161–7, 1, 2011.
- AMANN, R. P. Seminal Can Sample the Fertility Be Predicted Potential of a Accurately?. **Journal of Andrology**, v. 10, n. 2, p. 89–98, 1989.
- AMANN, R.; HAMMERSTEDT, R. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of andrology**, v. 14, n. 6, p. 397-406, 1993.
- AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 5- 17.e3, jan. 2014.
- ANDRADE, A.; DE ARRUDA, R.; CELEGHINI, E.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S.; RAPHAEL, C.; MORETTI, A. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 2, p. 190-194, 2007.
- ARRUDA, R.; CELEGHINI, E. D. C.; ALONSO, M.; CARVALHO, H.; OLIVEIRA, L.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.; AFFONSO, F.; LEMES, K.; JAIMES, J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n., p. 145-151, 2011.
- ARRUDA, R.; ORRO, I.; PASSOS, T.; COSTA E SILVA, E.; ZÚCCARI, C. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n., p. 168-184, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). **Index ASBIA Mercado**, 2019. Disponível em: <https://www.lancerural.com.br/vendas-de-semen-bovino-crescem-no-1o-semester-de-2018/presidente-da-asbia-sergio-saud-anuncia-aumento-nas-vendas-de-semen/>. Acesso em: 15.nov.2019.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES (ABIEC). **Sumário 2018**. Disponível em: <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>. Acesso em: 15.nov.2019.
- BARBAS, J.P.; LEAHY, T.; HORTA, A.E.; GARCÍA-HERREROS, M. Sperm kinematics and subpopulational responses during the cryopreservation process in caprine ejaculates. **Cryobiology**, v. 82, p. 137–147, 2018.
- BARTH, A. D.; OKO, R. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. v., n., p., 1989.
- BARUSSELI, P.S., REIS, E.L., MARQUES, M.O., NASSER, L.F., BO, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in

tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.479-486, 2004.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; COLLI, M. H. A.; ELLIFF, F. M.; FREITAS, B. G. Timed artificial insemination: current challenges and recent conquests for improving the efficiency in the field. **Animal Reproduction**, v.14, n.3, p.558-571, 2017.

BARUSELLI, P. S.; CATUSSI, B. L. C.; ABREU, L. A.; ELLIFF, F. M.; SILVA, L. G.; BATISTA, E. S.; CREPALDI, G.A. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2019)**. **Anais...** Gramado, RS: 2019.

BEIRÃO, J.; CABRITA, E.; PÉREZ-CEREZALES, S.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; HERRÁEZ, M.P.; 2011. Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. **Cryobiology**, 62, 22–31.

BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.38, n.4, p. 189-194, 2014.

BERGSTEIN-GALAN, T.G.; WEISS, R.R., KOZICKI, L.E.; BICUDO, S.D. Sperm subpopulations in ejaculated sperm and spermatozoa recovered from ovine epididymides up to 48 h after death. **Animal Reproduction Science**, v. 187, p. 20–27, 2017.

BERLINGUER, F.; MADEDDU, M.; PASCUI, V.; SUCCU, S.; SPEZZIGU, A.; SATTA, V.; MEREU, P.; LEONI, G. G.; NAITANA, S. Semen molecular and cellular features: these parameters can reliably predict subsequent ART outcome in a goat model. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 125, 2009.

BRITO, L.F.C. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v.6, p.249-264, 2007.

BROEKHUIJSE, M. L.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B.M. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1473–1486, 2011.

CELEGHINI, E.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte, 104 p.,2013.

CONTRI, A.; ZAMBELLI, D.; FAUSTINI, M.; CUNTO, M.; GLORIA, A.; CARLUCCIO, A. Artificial neural networks for the definition of kinetic subpopulations in electroejaculated and epididymal spermatozoa in the domestic cat. **Reproduction** 144, 339–347, 2012.

CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. M. Relationships among frozen-thawed

sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 721–731, 1997.

COX, J. F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p. 860-867, 2006.

CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; MARTINS JUNIOR, A.; DELL' AQUA JUNIOR, J. A. Evaluation of frozen bovine semen: How do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.16, p.335-342, 2009.

CURRY, M.R. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**. 5, 46–52, 2000.

CUTAIA, L., TRÍBULO, R., MORENO, D., BÓ, G.A. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). **Theriogenology**, v.59, p.216 (abstract), 2003.

DEL OLMO, E.; BISBAL, A.; MAROTO-MORALES, A.; GARCÍA-ALVAREZ, O.; RAMON, M.; JIMENEZ-RABADAN, P.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; SOLER, A.; GARDE, J.; FERNANDEZ-SANTOS, M. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 1, p. 102-109, 2013.

DONNELLY, E.T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. Glutathione and hypotaurine in vitro: Effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. **Mutagenesis**, v. 15, p. 61-68, 2000.

DONNELLY, E.T.; LEWIS, S. E.; MCNALLY, J. A.; THOMPSON, W. In vitro fertilization and pregnancy rates: The influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. **Fertility and Sterility**, v. 70, p. 305-314, 1998.

DORADO, J.; ALCARÁZ, L.; DUARTE, N.; PORTERO, J.M.; ACHA, D.; HIDALGO, M. Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. **Animal Reproduction Science**. V. 125, p. 211–218, 2011.

DURU, N. K.; MORSHEDI, M.; SCHUFFNER, A.; OEHNINGER, S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. **Fertility and sterility**, v. 75, n. 2, p. 263-268, 2001.

EL-HAIRY, M. A.; EID, L. N.; ZEIDAN, A. E. B.; EL-SALAAM, A. A.; EL-KISHK, M. A. M. Quality and fertility of the frozen-thawed bull semen as affected by the different cryoprotectants and glutathione levels. **Journal American Science**, v. 7, n. 5, p. 791–801, 2011.

ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S.D.; SARASA, J.; FERNÁNDEZ, J.L.; GONSÁLVEZ, J. Major morphological abnormalities in the Bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v. 26, p.23-32, 2011.

ESTRADA, E.; RIVERA DEL ÁLAMO, M.M.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; YESTE, M. The addition of reduced glutathione to cryopreservation media induces changes in the structure of motile subpopulations of frozen-thawed boar sperm. **Cryobiology**, v. 78, p. 56–64, 2017.

FERRAZ, M. A.; MORATO, R.; YESTE, M.; ARCARONS, N.; PENA, A. I.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; MUINO, R.; MOGAS, T. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. **Theriogenology**, v. 81, n. 8, p. 1067-1072, 2014.

FITZPATRICK, L. A.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M. R.; BERTRAM, J.D.; DOOGAN, V. J.; DE FAVERI, J.; MILLER, R. G.; HOLROYD, R. G. Bull selection and use in northern Australia. Part 2. Semen traits. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.39-49, 2002

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochim Biophys Acta**, v. 1469, p. 197–235, 2000.

FLORES, E.; TABERNER, E.; RIVERA, M. M.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; MIRÓ J, RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. **Theriogenology**, v.70, p.936- 945, 2008.

FLORES, E.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J.M.; PEÑA, A., RODRÍGUEZ-GIL, J.E. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 72, p. 784–797, 2009.

FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A. Importância da qualidade espermática sobre a predição do potencial de fertilidade in vivo em bovinos: contribuição da mitocôndria e das subpopulações espermáticas. 2017. 157f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017

FRASER, L. Markers for Sperm Freezability and Relevance of Transcriptome Studies in Semen Cryopreservation: A Review. **Theriogenology**, 2017.

FREITAS-DELL'AQUA, C.P; CRESPILO, A.M.; PAPA, F.O.; DELL' AQUA JUNIOR, J.A. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n., p. 213-222, 2009.

FRENEAU, G. E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.160-170, 2011.

GALLEGO, V.; CAVALCANTE, S.; FUJIMOTO, R.Y.; CARNEIRO, P. F.; AZEVEDO, H.C.; MARIA, A. N. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Theriogenology**, v.87, p.16-24, 2017.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; DEL OLMO, E.;

JIMÉNEZ- RABADÁN, P.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ANEL-LÓPEZ, L.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support *in vitro* capacitation and fertilization. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 5, p. 725–732, 2014.

GLIOZZI, T.; TURRI, F.; MANES, S.; CASSINELLI, C.; PIZZI, F. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. **Animal**, v. 11, n. 11, p. 1975-1982, 2017.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3, p. 239-247, 2001.

GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 492–504, 2005.

GUTIÉRREZ-REINOSO, M.; GARCÍA-HERREROS, M. Normozoospermic versus teratozoospermic domestic cats: Differential testicular volume, sperm morphometry, and subpopulation structure during epididymal maturation. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, p. 871–878, 2016.

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1122-1136, 2006.

HAMILTON, T. R. D. S.; MENDES, C. M.; CASTRO, L. S. D.; ASSIS, P. M. D.; SIQUEIRA, A. F. P.; DELGADO, J. D. C.; GOISSIS, M. D.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. Á.; NICHI, M. Evaluation of lasting effects of heat stress on sperm profile and oxidative status of ram semen and epididymal sperm. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v., n., p., 2016.

HIDALGO, M.; RODRÍGUEZ, I.; DORADO, J. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. **Theriogenology**, v. 66,n.4,p. 996–1003, 2006.

HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, I.; DORADO, J.; SANZ, J.; SOLER, C. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. **Veterinarni Medicina**, v.50, n.1, p. 24–32, 2005.

HOLROYD, R. G.; DOOGAN, V. J.; DE FAVERI J.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M. R., BERTRAM, J. D.; VANKAN, D. M.; FITZPATRICK, L. A.; JAYAWARDHANA, G. A.; MILLER, R. G. Bull selection and use in northern Australia 4: Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.67-79, 2002

HOSSAIN, M. S.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, A. P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian journal of andrology**, v. 13, n.

3, p. 406, 2011.

HOLT, W.V.A.; O BRIEN, J.B.; ABAIGAR, T.C. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 6, p. 709–718, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Sistema de Recuperação Automática (SIDRA)**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>.

İNANÇ, M. E.; CIL, B.; TEKIN, K.; ALEMDAR, H.; DAŞKIN, A. The combination of CASA kinetic parameters and fluorescein staining as a fertility tool in cryopreserved bull semen. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 42, n. 5, 452-458, 2018.

JANUŠKAUSKAS, A.; ŽILINSKAS, H. Bull Semen Evaluation Post-Thaw and Relation of Semen Characteristics To Bull's Fertility. **Veterinarija ir Zootechnika**. v. 17, n. 39, 2002.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; EDWIN, M. J.; VEERAPANDIAN, C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 1, p. 9-17, 2008

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; KARTHIKEYA, G.; RENGARAJAN, K.; KADIRVEL, G. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System—A Review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 165-172, 2011.

LAYEK, S. S.; MOHANTY, T. K.; KUMARESAN, A.; PARKS, J. E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 172, p. 1–9, 2016.

LI, Y.; KALO, D.; ZERON, Y.; ROTH, Z. Progressive motility – a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines. **Zygote**, p. 1–13, 2014.

LU, J. C., HUANG, Y. F., LU, N. Q. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. **Andrologia**, v.46, n4, 329-338, 2014.

LUNA, C.; YESTE, M.; DEL ALAMO, M. M. R.; DOMINGO, J.; CASAO, A.; RODRIGUEZ- GIL, J. E.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations in ram ejaculates. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 2, p. 394-405, 2017.

MARTINS, M. I. M.; SOUZA, A. K.; TRAUTWEIN, L. G. C. Subpopulações espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 243–247, 2017.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; HERRAEZ, P.;

- ANEL, L.; DE PAZ, P. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 2, p. 316-327, 2005.
- MARTINEZ-PASTOR, F.; CABRITA, E.; SOARES, F.; ANEL, L.; DINIS, M. T. Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts. **Reproduction**, v.135, p.449-459, 2008.
- MARQUES, M. O.; RIBEIRO JÚNIOR, M.; SILVA, R. C. P.; SÁ FILHO, M. F.; VIEIRA, L. M. BARUSELLI, P. S. Ressincronização em bovinos de corte. **Anais do 5o Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada (SIRAA)**, 2012, Londrina, PR, Brazil. Londrina: UEL. p.82-92, 2012.
- MENDOZA, N.; CASAO, A.; DEL VALLE, I.; SERRANO, E.; NICOLAU, S.; ASUMPCÃO, M. E.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; PÉREZ-PÉ, R. Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 880, n. 1, p. 74–81, 2012.
- MENKVELD, R.; HOLLEBOOM, C. A.; RHEMREV, J. P. Measurement and significance of sperm morphology. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n.1, p. 59-68, 2011.
- MISHRA, C.; PALAI, T. K.; SARANGI, L. N.; PRUSTY, B. R.; MAHARANA, B. R. Candidate gene markers for sperm quality and fertility in bulls. **Veterinary World**, v. 6, n. 11, p. 905–910, 2013.
- MORADO, S.; PEREYRA, V.; BREININGER, E.; SARA, R.; CETICA, P. Study of sperm evaluation parameters to estimate cryopreserved bovine semen fertility. **Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**, v. 2, n. 1, p. 1–4, 2015.
- MORRELL, J. M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A. M.; HAMMAR, L.; SANDERBET, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 1, p. 1–7, 2008.
- MORTIMER, D. Sperm preparation methods. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 3, p. 357-366, 2000.
- MORTIMER, D.; MENKVELD, R. Sperm Morphology Assessment--Historical Perspectives and Current Opinions. **Journal of Andrology**, V. 22, N. 2, P. 192-205, 2001.
- MUIÑO, R.; PEÑA, A. I.; RODRÍGUEZ, A.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. **Theriogenology**, v.72, p.860-868, 2009.
- MUIÑO, R.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C.; PEÑA, A. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls:

effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n. 1, p. 27-39, 2008.

NAGY, Á.; POLICHRONOPOULOS, T.; GÁSPÁRDY, A.; SOLTI, L.; CSEH, S. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.63, n. 3, 370-381, 2015.

NARESH, S.; ATREJA, S. Detection, Localization and Tyrosine Phosphorylation Status of Ser/Thr Protein Phosphatase1 γ in Freshly Ejaculated, In Vitro Capacitated and Cryopreserved Buffalo Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 6, p. 901-909, 2015.

NOGUEIRA, É.; DO NASCIMENTO BATISTA, D. S.; DA COSTA FILHO, L. C. C.; DIAS, A. M.; SILVA, J. C. B.; ÍTAVO, L. C. V. Pregnancy rate in lactating *Bos indicus* cows subjected to fixed- time artificial insemination and treated with different follicular growth inducers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 7, p. 358–362, 2014.

NOGUEIRA, É.; SILVA, C. S.; SILVA, J. C. B.; GARCIA, W. R.; ANACHE, N. A.; SILVA, K. C.; POTIENS, J. R.; COSTA e SILVA, E. V. Qualidade do sêmen e resultados em programas de IATF em bovinos. **Anais da IV Reunião Anual da Associação brasileira de Andrologia Animal (ABRAA)**, **Anais...Goiânia, GO: 2019.**

NTEMKA, A.; TSOUSIS, G.; BROZOS, C.; KIOSSIS, E.; BOSCO, C. M.; TSAKMAKIDIS, I. A. Breed differences of bull frozen-thawed semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 6, p. 945–952, 2016.

NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORAN, J.; PEÑA, F. A Three-Step Statistical Procedure to Identify Sperm Kinematic Subpopulations in Canine Ejaculates: Changes after Cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 5, p. 408-415, 2006.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.; SANTOS, R. M.; BELETTI, M. E.; PERES, R. F. G.; OLIVEIRA, C. S.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Assessment of field fertility and several *in vitro* sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. **Livestock Science**, v. 146, n. 1, p. 38–46, 2012.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.; REEB, P. D.; MARTINS, J. P. N.; SANTOS, R. M. Dos; BELETTI, M. E.; PERES, R. F. G.; MONTEIRO, F. M.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Assessment of *in vitro* sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal Reproduction Science**, v. 137, n. 3–4, p. 145–155, 2013.

OLIVEIRA, B. M.; ARRUDA, R. P.; THOMÉ, H. E.; MATURANA FILHO, M.; OLIVEIRA, G.; GUIMARÃES, C.; NICHI, M.; SILVA, L. A.; CELEGHINI, E. C. C. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. **Theriogenology**, v. 82, n. 5, p. 767–72, 15 set. 2014.

ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural Studies on the Fertilization of Mammalian Gametes. **International Review of Cytology**, v. 122, n. C, p. 105–151, 1990.

PEÑA, F. J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M. Assessment of fresh and frozen–thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 677-689, 2003.

PEÑA, A.I., BARRIO, M.; BECERRA, J.J.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Motile sperm subpopulations in frozen-thawed dog semen: Changes after incubation incapacitating conditions and relationship with sperm survival after osmotic stress. **Animal Reproduction Science**, v.133, p. 214-223, 2012.

PESH S, BERGMANN M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v.37, p.597-612, 2006.

PINTADO, B.; FUENTE, J.; ROLDAN, E.R.S. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.145-152, 2000.

PHILLIPS, N.J.; MCGOWAN, M. R.; JOHNSTON, S. D.; MAYER, D. G. Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use australian dairy AI sires. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.47-61, 2004.

PUGLIESI, G.; REZENDE, R. G.; DA SILVA, J. C. B.; LOPES, E.; NISHIMURA, T. K.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; BINELLI, M. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.140-150, 2017.

QUINTERO-MORENO, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p. 312–319, 2007.

RAHEJA, N.; CHOUDHARY, S.; GREWAL, S.; SHARMA, N.; KUMAR, N. A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, n. 3, p. 239–245, 2018.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. SUPPL. 2, p. 2–10, 2006.

RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. **Anais**... Belo Horizonte, MG: CBRA, 2013.

RUBIO-GUILLÉN, J.; GONZÁLES, D.; GARDE, J, ESTESO, M.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J.; MADRID-BURY, N.; QUINTERO-MORENO, A.

Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. **Reproduction Domestic Animals**, v.42, p.354-357, 2007

SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, M.; SANTOS, J. E. P.; PERRY, G.; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1–4, p. 23–30, 2010.

SÁ FILHO, O. G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 210–218, 2009.

SÁ FILHO, M. F.; PENTEADO, L.; REIS, E. L.; REIS, T. A. N. P. S.; GALVÃO, K. N.; BARUSELLI, P.S. Timed artificial insemination early in the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows. **Theriogenology**, v.79, n.4, p.625-632, 2013.

SÁ FILHO, O. G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v.72, p.210-218, 2009.

SANTOLARIA, P.; VICENTE-FIEL, S.; PALACÍN, I.; FANTOVA, E.; BLASCO, M.; SILVESTRE, M.; YÁNIZ, J. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 163, n., p. 82-88, 2015.

SANTOLARIA, P.; SOLER, C.; RECREO, P.; CARRETERO, T.; BONO, A.; BERNÉ, J. M.; YÁNIZ, J. L. Morphometric and kinematic sperm subpopulations in split ejaculates of normozoospermic men. **Asian journal of andrology**, v. 18, n. 6, p. 831, 2016.

SIQUEIRA, L. G.; AREAS, V. S.; GHETTI, A. M.; FONSECA, J. F.; PALHAO, M. P.; FERNANDES, C. A.; VIANA, J. H. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. **Journal Dairy Science**, v.96, p.6461-6472, 2013.

STEVENSON, J. S.; CARTMILL, J. A.; HENSLEY, B. A.; EL-ZARKOUNY, S. Z. Conception rates of dairy cows following early not-pregnant diagnosis by ultrasonography and subsequent treatments with shortened Ovsynch protocol. **Theriogenology**, v.60, p.475-483, 2003.

SANTOS, G.; TORTORELLA, R. D.; FAUSTO, D. A. Rentabilidade da monta natural e inseminação artificial em tempo fixo na pecuária de corte. **Revista IPecege**, v. 4, n. 1, p. 28–32, 2018.

SELLEM, E.; BROEKHUIJSE, M.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT, E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E. Use of combinations of in vitro quality assessments to

predict fertility of bovine semen. **Theriogenology**, v. 84, n. 9, p. 1447- 1454.e5, 2015.

SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. **A Hora Veterinária**, v. 28, n. 167, p. 36–39, 2009.

SIMONIK, O.; SICHTAR, J.; KREJCARKOVA, A.; RAJMON, R.; STADNIK, L.; BERAN, J.; BINIOVA, Z. Computer assisted sperm analysis—the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: a review. **Indian Journal Animal Science**, v.85, n.1, p. 3-11, 2015.

SHIBAHARA, H.; OBARA, H.; AYUSTAWATI, HIRANO, Y.; SUZUKI, T.; OHNO, A.; SUZUKI, M. Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. **International Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, 63–68, 2004.

SOUZA, A.K.; TRAUTWEIN, L.G.C.; PARANZINI, C.S.; PERENCIN, F.M.; CARDOSO, G.S.; MARTINS, M.I.M. Influence of cooling temperature in sperm subpopulations of domestic cats. **Animal Reproduction Science**, v. 189, p. 1–10, 2018.

SUAREZ, S. S.; KATZ, D. F.; OWEN, D. H. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. **Biology of Reproduction**, v.44, p. 375-381, 1991.

SUKCHAROEN, N.; SITHIPRAVEJ, T.; PROMVIENGCHAI, S.; CHINPILAS, V.; BOONKASEMSANTI, W. Sperm morphology evaluated by computer (IVOS) cannot predict the fertilization rate in vitro after intracytoplasmic sperm injection. **Fertility and Sterility**, v. 69, p. 564-568, 1998.

THOMAS, C. A.; GARNER, D. L.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric Assessments of Acrosomal Integrity and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa1. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 4, p. 991–998, 1997.

VALVERDE, A.; ARENÁN, H.; SANCHO, M.; CONTELL, J.; YÁNIZ, J.; FERNÁNDEZ, A.; SOLER, C. Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws. **Asian journal of andrology**, v. 18, n. 6, p. 851, 2016.

VÁZQUEZ, A. J. F.; CEDILLO, M. J.; QUEZADA, V. J.; RIVAS, A. C.; MORALES, E. C. L.; AYALA, E. M. E.; HERNANDEZ, M.J.; GONZÁLEZ, R.A.; Aragón, M. A. (2015). Effects of repeated electroejaculations on kinematic sperm subpopulations and quality markers of Mexican creole goats. **Animal Reproduction Science**, v.154, 29–38, 2015.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149–179, jan. 2002.

VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.; PUGLIESI, G.; GUERREIRO, B. M.; CRISTALDO, M. A.; BATISTA, E. O. S.; FREITAS, B. G.; CARVALHO, F. J.; GUIMARAES, L. H.

C.; BARUSELLI, P. S. Resynchronization in dairy cows 13 days after TAI followed by pregnancy diagnosis based on corpus luteum vascularization by color doppler. **Animal Reproduction**, v.11, p.378, 2014. (Resumo).

VINCENT, P.; UNDERWOOD, S. L.; DOLBEC, C.; BOUCHARD, N.; KROETSCH, T.; BLONDIN, P. Bovine Semen Quality Control in Artificial Insemination Centers. **Bovine Reproduction**, p. 685–695, 2014.

WATSON, P. F. Recent Developments and Concepts in the Cryopreservation of Spermatozoa and the Assessment of their Post-thawing Function. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 7, p. 871–891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.

YÁNIZ, J.; VICENTE-FIEL, S.; SOLER, C.; RECREO, P.; CARRETERO, T.; BONO, A.; BERNÉ, J.; SANTOLARIA, P. Comparison of different statistical approaches to evaluate morphometric sperm subpopulations in man. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, p. 819–823, 2016.

YÁNIZ, J. L.; SILVESTRE, M. A.; SANTOLARIA, P.; SOLER, C. CASA-Mot in mammals: an update. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 6, 2018

4 HIPÓTESE

A análise de diferentes atributos e a caracterização das subpopulações espermáticas, possibilita identificar touros com menor e maior potencial de fertilidade utilizados na Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os parâmetros morfológicos, cinéticos e de subpopulações espermáticas de amostras de sêmen de touros Nelore e Angus que resultam em menor ou maior taxa de gestação à IATF, a fim de se estabelecer um método preditivo da qualidade seminal que permitam a seleção de reprodutores mais eficientes.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Comparar qualitativamente os atributos espermáticos em amostras de sêmen descongelado de touros com resultados de menor e maior taxa de gestação à IATF;
- 2- Caracterizar as subpopulações espermáticas, determinadas pelo sistema CASA, no sêmen de touros utilizados à IATF;
- 3- Diferenciar o perfil das subpopulações espermáticas, determinadas pelo sistema CASA, no sêmen de touros de menor e maior fertilidade à IATF.

6 ARTIGO1 (Formato- Periódico: Livestock- ainda sem tradução)**Relação das subpopulações espermáticas em Touros Nelore e Angus com taxas de gestação na IATF****RESUMO**

A predição do desempenho de touros na Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), pela avaliação seminal, não está completamente estabelecida. Este estudo, teve por objetivo caracterizar as diferenças nos atributos espermáticos de touros com menor e maior desempenho reprodutivo, baseado nas taxas de gestação, visando estabelecer um método preditivo de maior eficiência na IATF. Com base no histórico da estação de monta entre setembro de 2017 à março de 2018 de quatro propriedades, foram selecionados 24 touros, da raça Angus (N= 9) e Nelore (N=15) que apresentaram variações nas taxas de gestação, estabelecendo-se dois grupos experimentais a partir da mediana: sendo o grupo de menor fertilidade (MENOR), touros que apresentaram resultados no programa de IATF < 52,27% (min: 33,33 %; máx: 51,81%), e grupo de maior fertilidade (MAIOR), touros que apresentaram resultados de taxa de prenhez superiores a 52,27% (min: 52,27%; máx: 69,64%). Foram analisadas uma partida de sêmen descongelado de cada touro, nas quais os atributos avaliados foram: cinética espermática pelo sistema CASA; morfologia e integridade de membrana plasmática pela coloração eosina/nigrosina, em microscópio óptico, e a caracterização das subpopulações espermáticas com o *software* EDIT/SORT (sistema CASA; Hamilton Thorne, Ivos 14.0, Beverly, MA, EUA) e estatística multivariada. Diferenças entre grupos (MENOR vs. MAIOR) foram estimadas pelo teste t, e considerado nível de significância < 5%. O grupo MAIOR apresentou valores superiores para integridade de membrana (MENOR: 78,83% vs. MAIOR: 83,25%; p= 0,039), no entanto, para morfologia espermática não houve diferença entre os grupos: defeitos maiores (MENOR: 6,75% vs. MAIOR: 5,91%; p= 0,620), defeitos menores (MENOR: 12,25% vs. MAIOR: 12,08%; p= 0,954) e defeitos totais (MENOR: 19% vs. MAIOR: 17,91%; p= 0,743). Na análise de cinética espermática, foram encontradas diferenças entre os grupos, no qual, no grupo MAIOR foram identificadas maiores porcentagens (%) para: motilidade total (MENOR: 51,50% vs. MAIOR: 73,08%; p= 0,001); motilidade progressiva (MENOR: 29,33% vs. MAIOR: 32,33%; p= 0,007); células rápidas (RAPID; MENOR: 43,08% vs. MAIOR: 57,83%; p=0,002) e células com velocidade média (MEDIUM; MENOR: 8,5% vs. MAIOR: 15,41%; p=0,006) em contrapartida, o grupo MENOR apresentou maiores proporções de células estáticas (ESTATIC; MENOR: 27,33% vs. MAIOR: 6,41%; p= 0,001). Com base nos resultados de cinética foram caracterizadas estatisticamente quatro subpopulações espermáticas: 1-Rápidos e progressivos; 2- Lentos e progressivos; 3- Hiperativados; 4- Lentos e sinuosos. Sendo que touros com maior desempenho (MAIOR) apresentaram maior percentual de subpopulação 3 (34,45%), e no grupo de menor fertilidade (MENOR) maior percentual da subpopulação 2 (42,29%). Com isto, demonstra-se ser possível diferenciar touros de menor e maior desempenho na IATF, pela avaliação dos atributos espermáticos e o estudo das subpopulações espermáticas constituindo-se, como um método efetivo para a predição do desempenho na biotecnologia da IATF.

Palavras-chave: Fertilidade; Touros; Sêmen; Sistema CASA; IATF.

Relationship of sperm subpopulations in Bulls Nelore and Angus with pregnancy rates in IATF

ABSTRACT

The prediction of bull performance in Fixed Time Artificial Insemination (FTAI), by seminal evaluation, is not fully established. This study aimed to characterize the differences in sperm attributes and subpopulations of bulls with minor and major reproductive performance, based on pregnancy rates, aiming to establish a more efficient predictive method in IATF. Based on the history of the breeding season between September 2017 and March 2018 of four farms, 24 bulls were selected, Angus (N = 9) and Nelore (N = 15), which showed variations in pregnancy rates, establishing 2 experimental groups from the median (52,27%): the group with minor pregnancy rate (MINOR), bulls that presented results in the IATF program <52.27% (min: 33.33%; max: 51.81%), and group of high pregnancy rate (MAJOR), bulls that presented results of pregnancy rate above 52.27% (min: 52.27%; max: 69.64%). A dose of frozen semen from each bull was analyzed, in which the attributes evaluated were: sperm kinetics by the CASA system; plasma membrane morphology and integrity by eosin / nigrosine staining, under an optical microscope, and the characterization of sperm subpopulations with the EDIT / SORT software (CASA system; Hamilton Thorne, Ivos 14.0, Beverly, MA, USA) and multivariate statistics. Differences between groups (MINOR vs. MAJOR) were estimated by the t-test, and the significance level <5% was considered. The MAJOR group showed higher values for membrane integrity (MINOR: 78.83% vs. MAJOR: 83.25%; $p = 0.039$), however, for sperm morphology there was no difference between the groups: major defects (MINOR: 6, 75% vs. MAJOR: 5.91%; $p = 0.620$), minor defects (MINOR: 12.25% vs. MAJOR: 12.08%; $p = 0.954$) and total defects (MINOR: 19% vs. MAJOR: 17.91%; $p = 0.743$). In the analysis of sperm kinetics, differences were found between the groups, in which, in the MAJOR group, higher percentages (%) were identified for: total motility (MINOR: 51.50% vs. MAJOR: 73.08%; $p = 0.001$); progressive motility (MINOR: 29.33% vs. MAJOR: 32.33%; $p = 0.007$); fast cells (RAPID; MINOR: 43.08% vs. MAJOR: 57.83%; $p = 0.002$) and cells with medium speed (MEDIUM; MINOR: 8.5% vs. MAJOR: 15.41%; $p = 0.006$) in contrast, the MINOR group had higher proportions of static cells (STATIC; MINOR: 27.33% vs. MAJOR: 6.41%; $p = 0.001$). Based on the kinetics results, four sperm subpopulations were statistically characterized: 1-Fast and progressive; 2- Slow and progressive; 3- Hyperactivated; 4- Slow and winding. Major performance bulls (MAJOR) had the highest percentage of subpopulation 3 (34.45%), and in the minor fertility group (MINOR) the highest percentage of subpopulation 2 (42.29%). This shows that it is possible to differentiate bulls with minor and major fertility in the FTAI, by the study of sperm subpopulations, constituting itself as an effective method for predicting performance in FTAI biotechnology.

Key-words: Fertility. Bulls. Semen. CASA System. FTAI.

1 Introdução

Atualmente, é fundamental desenvolver e aprimorar tecnologias que contribuam com o aumento da produtividade nas propriedades, otimizando os sistemas de criação e a rentabilidade dos rebanhos (Baruselli et al., 2019). Neste contexto, o incremento nos índices reprodutivos e consequentemente produtivos, pode ser alcançado com o uso de biotécnicas, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que elimina a necessidade de detecção de estro e possibilita maior número de animais inseminados em tempo reduzido (Dos Santos, Tortorella, & Fausto, 2018). A qualidade do sêmen do touro utilizado é um dos fatores cruciais para a eficiência do protocolo de IATF. Portanto, o uso de sêmen de baixa qualidade pode interferir negativamente, sobre a resposta reprodutiva de um programa, inviabilizando todos os esforços empreendidos e investidos na propriedade (Severo, 2009).

De fato, a capacidade de predição da qualidade do sêmen na fertilidade dos machos e ejaculados precisa ser aperfeiçoada (Yániz et al., 2015). Segundo García-Álvarez et al. (2014), o pouco esclarecimento à cerca da diferença no potencial de fertilidade de uma partida de sêmen pode ser em função de características espermáticas não avaliadas. A heterogeneidade da população espermática de determinado ejaculado pode justificar mudanças no potencial de fertilidade das partidas de sêmen, existindo diferença entre touros, entre ejaculados do mesmo indivíduo e até mesmo, dentro do mesmo ejaculado, existem populações com diferentes estruturas, formas e graus de funcionalidade.

Entretanto, na avaliação convencional da qualidade do sêmen, a divisão dessas subpopulações não é avaliada, o que pode interferir na correta qualificação do ejaculado (Quintero-Moreno, Miró, Teresa Rigau, & Rodríguez-Gil, 2003; Barbas, Leahy, Horta, & García-Herreros, 2018). A determinação das subpopulações espermáticas, detalhadas com base na cinética individual dos espermatozoides já foi relatada em diferentes espécies animais, como gatos (Gutiérrez-Reinoso and García-Herreros, 2016; Souza et al., 2018), cães (Núñez-Martínez et al., 2006; Peña et al., 2012), garanhões (Quintero-Moreno et al., 2003), jumentos (Flores et al., 2008), carneiros (Dorado et al., 2011; Santolaria et al., 2015; Bergstein-Galan, Weiss, Kozicki, & Bicudo, 2017; Barbas et al., 2018), javalis (Quintero-Moreno et al., 2003; Flores, Fernández-Novell, Peña, & Rodríguez-Gil, 2009; Estrada, Rivera del Álamo, Rodríguez-Gil, & Yeste, 2017), coelhos (Quintero-Moreno et al., 2007), veados

(Martinez-Pastor et al., 2005), entre outros. Em bovinos, estudos com sêmen fresco e amostras descongeladas, identificaram quatro subpopulações de espermatozoides (Muiño, Rivera, Rigau, Rodriguez-Gil, & Peña, 2008a; Muiño, Tamargo, Hidalgo, & Peña, 2008b; Muiño, Peña, Rodríguez, Tamargo, & Hidalgo, 2009; Ferraz et al., 2014).

A partir dos parâmetros cinéticos, obtidos por meio da análise computadorizada do sêmen (sistema CASA), o *software* é capaz de subdividir os espermatozoides em categorias pré-definidas e até mesmo subpopulações, a qual divide os espermatozoides de uma única análise espermática em *clusters* (Bergstein et al., 2014). O método demonstrou ser um dos mais acurados e confiáveis para estudar subpopulações espermáticas (Barbas et al., 2018).

A identificação e quantificação das subpopulações espermáticas podem contribuir de forma fundamental para estimar a capacidade de fertilização de amostras de sêmen de bovinos, como também gerar avanços para a avaliação de protocolos de criopreservação (Muiño, Rivera, et al., 2008a). Essa avaliação também pode repercutir positivamente na economia, uma vez que aperfeiçoando os métodos de análise do sêmen seria possível selecionar indivíduos mais eficientes para reprodução (Quintero-Moreno et al., 2003).

Existem poucos estudos que correlacionem as subpopulações dos espermatozoides, a qualidade do ejaculado e a capacidade fecundante em touros (Ferraz et al., 2014). Ao conhecimento dos autores, este é, o primeiro trabalho que pesquisa a relação das subpopulações espermáticas com as taxas de gestação obtidas pela IATF. Desta forma, o objetivo foi identificar e caracterizar as subpopulações espermáticas de touros Nelore e Angus, provenientes de programas de IATF, que resultam em menor ou maior taxa de gestação à IATF, a fim de melhorar a predição da fertilidade de touros utilizados em biotécnicas reprodutivas.

2 Material e Métodos

2.1 Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UUEL, N° 22459.2018.38).

2.2 Coleta dos dados de inseminação artificial em tempo fixo e taxa de prenhez

Foram compilados dados da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) com resultados de taxa de gestação, obtidos a partir do histórico de quatro propriedades atendidas por um único médico veterinário autônomo, referentes a estação de monta entre os meses de setembro de 2017 a março de 2018. Em todas as propriedades, os animais eram mantidos em pasto composto por *Uruchola brizantha*, suplementados com sal mineral e livre acesso à água. As fêmeas apresentavam idade entre 2 e 10 anos e ECC médio de 2,93 (min: 2,5; máx: 4), em uma escala de 1 a 5 (onde 1: magra e 5: obesa, Ayres et al., 2009).

Todas as fêmeas da raça Nelore (N= 1911) foram submetidas ao mesmo protocolo da IATF, inseminadas e avaliadas pelo mesmo técnico. O protocolo hormonal incluiu três tratamentos, iniciados em um dia aleatório do ciclo estral. No dia 0 (D0), foi inserido um dispositivo intravaginal contendo 1,2 g de progesterona (P4) (Fertilcare Implante 1200®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), associado à aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (Fertilcare Sincronização®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), por via intramuscular. No dia 8 (D8), o dispositivo de P4 foi removido e juntamente com 2 mL de cloprostenol sódico (Estron- cloprostenol®, Agener União Saúde Animal, São Paulo, Brasil) foram administrados; 0,5 mg de cipionato de estradiol (CE) (Fertilcare Ovulação®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (Folligon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), por via intramuscular. A inseminação artificial foi realizada no dia 10 (D10), a partir de 48 horas após a remoção do dispositivo P4 e o diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia transretal (Aloka SSD-500®, 5,0 MHz), 30 dias após a IATF.

2.3 Seleção dos touros, doses e acondicionamento das amostras

As partidas de sêmen foram selecionadas com base nos dados retrospectivos da IATF e disponibilidade das doses nas propriedades. Foram utilizadas 24 doses de sêmen congelado de touros, das raças Nelore (N= 15) e Angus (N= 9) sendo uma partida (250µL) de cada touro, todas com concentração entre 16 a 20 x 10⁶ espermatozoides e aprovadas seguindo as exigências para comercialização (CBRA, 2013). As palhetas foram separadas e acondicionadas em botijão de nitrogênio líquido

(-196°C), até o momento das análises. A determinação dos grupos de menor ou maior fertilidade foi estabelecido segundo a mediana (52,27%), sendo que touros que apresentaram resultados < 52,27% de taxa de gestação (min: 33,33%; máx: 51,81%), foram considerados grupo MENOR e touros que apresentaram resultados > 52,27% de taxa de gestação (min: 52,27%; máx: 69,64%), foram integrados no grupo MAIOR. A média da taxa de gestação para cada touro foi obtida por meio dos resultados compilados dos diagnósticos realizados por ultrassom 30 dias após as inseminações.

2.4 Análises do sêmen

Todas as avaliações do sêmen foram processadas no Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida (LARAA). Para as análises, foram utilizadas uma partida de sêmen de cada touro (N=24) e descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Após a descongelação, todas as amostras foram depositadas em microtubos plásticos de 1,5 mL, previamente aquecidos à 37° em placa aquecedora e, após 2 minutos, submetidas às avaliações espermáticas.

2.4.1 Análise da morfologia e integridade de membrana plasmática do espermatozoide

Para análise das características morfológicas dos espermatozoides, uma alíquota de 3µL do sêmen pós- descongelação foi depositada sobre lâmina de vidro (Precision Glass Line®) de 26 x 76 mm e 1,0 a 1,2 mm de espessura, em seguida, foi adicionado 3µL de corante supravital eosina/nigrosina (BotuVital- Botupharma®, Botucatu, SP, Brasil) e realizado o esfregaço, após 5 minutos foi realizada a leitura. Para cada amostra de sêmen, foi realizada a contagem de 200 células, em aumento de 100x, sob microscopia óptica (Olympus®, CX31, Tokyo, Japão), para a aferição das morfologias espermáticas, juntamente com a integridade de membrana. As alterações morfológicas foram classificadas em defeitos maiores e menores, conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Para a avaliação da integridade de membrana plasmática, foi seguido orientação do fabricante, no qual espermatozoides corados em rosa, apresentavam membrana plasmática lesada e espermatozoides com ausência de coloração apresentavam membrana plasmática íntegra. Todas as análises foram realizadas pelo mesmo técnico e expressos em porcentagem (%).

2.4.2 Análise da cinética e subpopulações espermáticas

Os parâmetros da cinética espermática geral e individual, foram determinados utilizando a análise computadorizada de sêmen (sistema CASA; Hamilton Thorne, Ivos 14.0, Beverly, MA, EUA), com o *setup* pré-ajustado para espécie bovina e adaptado por HTR, tendo como base: campos adquiridos, 30; quadros, 60 Hz; números de quadros, 5; contraste estático mínimo, 30; tamanho mínimo da célula, 5 pixels; retilinearidade (STR), limiares 70%; VAP cut-off ($\mu\text{m/s}$), 30; Mínimo progressivo VAP ($\mu\text{m/s}$), 50; VSL cut-off ($\mu\text{m/s}$), 15; Intensidade da célula, 70 e Magnificação, 1,89. Para extrair os dados da análise da cinética individual dos espermatozoides para a identificação das subpopulações espermáticas, foi utilizado o *software* HTM-IVOS EDIT/ SORT (Versão, 14.0) do sistema CASA, e posteriormente para caracterização das subpopulações foi utilizada a estatística multivariada.

Para a avaliação, uma alíquota de 3 μL da amostra foi colocada na câmara CellVu® (DRM-610, Millenium Sciences, New York, USA) e coberto com uma lamínula de 22 x 22 cm (Kasvi®, Curitiba, Brasil), previamente aquecidas a 37°C em placa aquecedora. Após 1 minuto, para efetuar a leitura, foram considerados cinco campos microscópicos selecionados aleatoriamente em cada amostra, seguindo as orientações da aplicação do sistema CASA na análise dos espermatozoides (ESHRE, 1998). As seguintes variáveis foram consideradas: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade média da trajetória (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH, μm), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) calculado pela relação entre (VSL/VAP) x 100, linearidade (LIN, %) razão entre (VSL/VCL) x 100, coeficiente de wobble (WOB, %) que é a taxa de oscilação obtido pela razão entre (VAP/VCL) x 100 e Dance (DNC, μm^2) obtido pela razão VCL x ALH. Além disso, os espermatozoides também foram classificados em quatro grupos com base em sua velocidade: rápida (RAPID, $\mu\text{m/s}$; %), média (MEDIUM, $\mu\text{m/s}$; %), lenta (SLOW, $\mu\text{m/s}$; %) e estática (STATIC; espermatozoides sem movimento, %). Todas as análises de sêmen foram realizadas pelo mesmo técnico.

2.5 Análise estatística

Para avaliar o efeito das variáveis, como: escore de condição corporal (ECC) e categoria das vacas (novilhas ou vacas, primíparas ou múltiparas); raça dos touros; fazenda e o efeito do touro sobre a taxa de gestação, foi utilizado o modelo linear generalizado. A variável inseminador não foi considerada pois os protocolos hormonais, inseminações e diagnósticos gestacionais foram executados pelo mesmo técnico.

Com o objetivo de comparar a média dos parâmetros de morfologia espermática, integridade de membrana plasmática e cinética espermática entre os grupos de menor e maior fertilidade, foi utilizado o teste T. Os resultados foram apresentados com estimativas de médias e erro padrão e considerado o nível de significância de $p < 0,05$.

Para determinação das subpopulações espermáticas, foi aplicada a análise estatística em três etapas, seguindo a metodologia proposta por Núñez-Martínez et al. (2006), utilizando os dados individualmente da cinética espermática obtida de cada reprodutor. O primeiro passo foi a utilização das análises dos principais componentes (APC), cuja proposta foi derivar pequenos números de combinações lineares (principais componentes), esta análise determinou os principais parâmetros de cinética, que sumarizavam as informações originais, permitindo reduzir o número de variáveis. O segundo passo foi utilizar a análise não-hierárquica usando o modelo K-médias que usa a Distância Multivariada Euclidiana para calcular os grupos centrais. O terceiro passo foi utilizar um método discriminante dos grupos obtendo números reduzidos de grupos e ajudar na interpretação dos dados obtidos da análise K-médias. O número específico de grupos foi baseado numa análise de dendrograma hierárquico, constituindo um “ejaculado individual”.

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o *software* R (2019), versão 3.6.2.

3 Resultados

Para determinação da eficiência reprodutiva, além da avaliação do potencial

dos touros, outros fatores foram avaliados como: escore de condição corporal (ECC) e categoria das vacas, raça dos touros e fazenda. Contudo, quando foi avaliado o efeito das variáveis: escore de condição corporal (ECC) ($p= 0,292$), categoria da fêmea ($p= 0,087$), raça dos touros ($p=0,431$) e fazenda ($p= 0,783$) sobre a taxa de gestação, foi observado que não houve diferença ($p>0,05$). Entretanto, para o fator touro, foi observado diferença ($p= 0,003$), demonstrando que o touro teve influência sobre a taxa de gestação.

Quando avaliado os parâmetros de: concentração e morfologia espermática, considerando as variáveis: defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais, os resultados dos grupos MENOR e MAIOR não apresentaram diferenças ($p >0,05$). Entretanto, na avaliação da integridade de membrana plasmática, foi observado diferença ($p= 0,039$) entre os grupos, no qual o grupo MAIOR apresentou porcentagem superior de células íntegras (Tabela1).

Com relação aos parâmetros cinéticos avaliados pelo sistema CASA, foram identificados valores superiores no grupo de maior fertilidade (MAIOR), para as variáveis: motilidade total (MT); ($p=0,001$), motilidade progressiva (MP); ($p=0,007$), células com velocidade rápida (RAPID); ($p= 0,002$) e células com velocidade média (MEDIUM); ($p= 0,006$). Contudo, o contrário ocorreu para as células STATIC; ($p=0,001$), que foram encontradas em maiores proporções no grupo MENOR (Tabela 2).

Por meio da Análise de Principal Componente (APC), para ambos os grupos (MENOR e MAIOR), foram definidos por dendrograma hierárquico três grupos com interações mais altas em três momentos (PC1, PC2 e PC3). Considerando os valores da cinética espermática, o primeiro principal componente (PC1), explicou a maior parte dos resultados e apresentou movimentos rápidos não-lineares, compostos pelas variáveis; VAP, VSL, VCL, ALH e DANCE, o segundo principal componente (PC2) representou movimentos oscilatórios e lineares, compostos por: LIN, STR e WOBBLE e o terceiro principal componente (PC3) representou a frequência de batimento de cauda, caracterizados por BCF (Figura 1).

De forma individualizada, pelo *software* EDIT/ SORT no sistema CASA, foram avaliados 16.484 espermatozoides no grupo MENOR e 22.346 espermatozoides no grupo MAIOR, para os parâmetros da cinética espermática (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN, WOB e DANCE). Pela aplicação do método estatístico multivariado *cluster*, baseado na distância Euclidiana (K-means), foram definidas quatro

subpopulações espermáticas (SBP1, SBP2, SBP3, SBP4). As descrições das características dos movimentos espermáticos e dos parâmetros da cinética espermática para determinação das subpopulações estão apresentadas na Tabela 3 e os resultados das subpopulações nos diferentes grupos nas Tabelas 4 e 5.

Quando comparado o percentual de espermatozoides em cada subpopulação entre os grupos de MENOR e MAIOR fertilidade, logo após a descongelação do sêmen, o grupo MENOR, apresentou maior proporção de espermatozoides da SBP2 (41,29%), lentos e progressivos, seguido da SBP3 (28,69%), hiperativados (Tabela 4). Ao passo que, no grupo MAIOR, foi observado maior proporção de espermatozoides da subpopulação 3 (SBP3; 34,45%), hiperativados, seguido da subpopulação 2 (SBP2; 33,25%), espermatozoides lentos e progressivos (Tabela 5).

4 Discussão

A análise dos atributos e subpopulações espermáticas do touro foi um fator determinante para o sucesso da IATF. Pois, ao considerarmos as variáveis que podem influenciar o sucesso dos protocolos de IATF, como o escore de condição corporal (ECC) e categoria da fêmea, raça animal, fazenda e o inseminador, para determinação da eficiência reprodutiva, destacadas por Oliveira et al. (2012), foi observado apenas influência do touro sobre a taxa de gestação. No presente estudo, isto provavelmente ocorreu pelas variáveis à campo apresentarem um número considerável de vacas inseminadas (N=1911) com pequena variação de categoria e ECC (2,93; min: 2,5; máx: 4), os protocolos hormonais, inseminações e diagnósticos por ultrassom serem realizados pelo mesmo técnico e em todas as propriedades os animais receberem o mesmo manejo, aumentando-se a acurácia dos resultados à campo. Em relação ao efeito do touro encontrado, ele vai de acordo com outros estudos, em que foram relatados que diferenças nas taxas de gestação podem ser atribuídas às variações qualitativas das características espermáticas, evidenciando importante variabilidade individual do reprodutor com relação à fertilidade à campo (Sá Filho et al., 2009; Sudano et al., 2011). Ademais, vale ressaltar, que ao conhecimento dos autores, este é o primeiro trabalho que avalia a relação das subpopulações espermáticas e as taxas de gestação obtidas por Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).

A avaliação da morfologia espermática permite a identificação de touros com

baixo potencial de fertilidade, evitando a entrada desses animais nos programas de congelação de sêmen (Januškauskas and Žilinskas, 2002). Neste trabalho, a análise desse parâmetro não diferenciou touros de menor ou maior taxa de gestação. Porém, cabe destacar que nos grupos avaliados o valor percentual médio de defeitos menores, maiores e totais foram baixos e dentro dos limites preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Este resultado é esperado, visto que todas as amostras seminais utilizadas provêm de touros de centrais de biotecnologia reprodutiva onde se têm nutrição e instalações favoráveis à reprodução evitando-se, por exemplo, estresse térmico e hídrico, adicionados à intensa seleção de animais com características reprodutivas desejáveis (Rahman et al., 2018).

Além das características morfológicas, a avaliação da integridade da membrana plasmática foi aplicada como parâmetro na diferenciação entre menor e maior potencial de fertilidade na IATF. Os percentuais de membrana plasmática íntegra apresentaram diferença ($p=0,039$) entre os grupos, indicando menores proporções de membrana íntegra no grupo MENOR em relação ao grupo MAIOR, o que corrobora com Garner, Pinkel, Johnson, & Pace (1986) no qual relataram que células espermáticas com membrana lesada possuíam cinética inferior. Resultados similares, também foram descritos em estudo comparando búfalos, em que diferenças no desempenho reprodutivo foram relatadas, ressaltando que este parâmetro contribuiu com a predição da fertilidade à campo (Singh et al., 2016). O mesmo também ocorreu quando houve comparação entre variações de taxas de fertilização *in vitro* em touros de diferentes raças (Tanghe, Van Soom, Sterckx, Maes, & De Kruif, 2002) e em touros Angus (Tartaglione & Ritta, 2004), no qual a avaliação da viabilidade espermática pela técnica de eosina/nigrosina, representou um parâmetro confiável para a predição do desempenho *in vitro*. Estes resultados sugerem, que espermatozoides com membrana plasmática íntegra possuem maior viabilidade para se capacitar, manter o acrossoma intacto, e realizar reação acrossomal, assim como apresentar boa motilidade, características cruciais para a fecundação. Evidenciando assim, a importância da avaliação desse atributo espermático como método preditivo. Além disso, se considerarmos, em termos práticos, as avaliações andrológicas de rotina à campo, a técnica de eosina-nigrosina apresenta algumas vantagens, como o fato de ser executado por equipamentos portáteis e mais acessíveis, ser rápida e apresentar baixo custo, facilitando seu uso no campo.

O sêmen considerado de qualidade superior pela avaliação da cinética espermática no sistema CASA, apresentou valores maiores para os parâmetros de MT (%), MP (%) e maiores proporções de células RAPID (%) e MEDIUM (%). Já para o sêmen considerado com qualidade inferior, o grupo apresentou maiores proporções de células STATIC (%). As diferenças encontradas entre os grupos, corroboram com estudos prévios realizados em gado leiteiro, nos quais relata-se que altos percentuais de MP e células RAPID revelam maior resistência à criopreservação, ressaltando a importância desses parâmetros em relação aos outros também analisados pelo sistema CASA (Kathiravan, Kalatharan, Karthikeya, Regarajan, & Kadirvel, 2011). Resultados semelhantes também foram descritos por Shojaei et al. (2012), cujo o sêmen descongelado de dez touros da raça holandesa com alta fertilidade apresentaram valores superiores de motilidade total, progressiva e ALH .

Embora neste estudo tenham sido identificadas diferenças ($p < 0,05$) apenas para alguns parâmetros cinéticos fornecidos pelo sistema CASA, como: MT, MP, células RAPID e MEDIUM, as variáveis VAP, VSL, VCL e a ALH têm mostrado correlação positiva com taxa de fertilização nos índices reprodutivos utilizando doses de sêmen bovino congeladas (Kathiravan, Kalatharan, Karthikeya, Rengarajan, & Kadirvel, 2011; Nagy, Polichronopoulos, Gáspárdy, Solti, & Cseh, 2015; Inanç, Çil, Tekin, Alemdar, & Daşkin, 2018).

Durante a análise do dendrograma, foram observadas interações entre os parâmetros cinéticos avaliados, no qual os espermatozoides foram classificados de acordo com o peso de seus principais componentes (PCA1; PCA2; PCA3), formando quatro grupos (SBP1; SBP2; SBP3; SBP4). Apesar de já ter sido relatado estudos com três clusters em diferentes espécies (Flores et al., 2008; Santolaria et al., 2015; Vázquez et al., 2015; Gallego et al., 2017; Souza et al., 2018), esses resultados corroboram com os trabalhos realizados em sêmen fresco e amostras descongeladas de bovinos, no qual os autores identificaram quatro subpopulações de espermatozoides (Muiño, Rivera, et al., 2008a; Muiño, Tamargo, et al., 2008b; Muiño et al., 2009; Ferraz et al., 2014), sendo: (1) de baixa velocidade e alta progressividade; (2) alta motilidade, mas ausência de espermatozoides com movimento progressivo; (3) células com baixa motilidade e sem movimento progressivo; (4) composta por espermatozoides rápidos com movimentos progressivos (Muiño, Rivera, Rigau, Rodriguez-Gil, & Peña, 2008a; Muiño, Tamargo, Hidalgo, & Peña, 2008b; Muiño, Peña, Rodríguez, Tamargo, & Hidalgo, 2009).

Neste estudo, foi observado que a subpopulação mais presente no grupo de menor fertilidade (MENOR), foi a SBP2, de espermatozoides com cinética lenta e progressiva, identificada por valores baixos de VAP, VCL, ALH e parâmetros de DANCE e STR com valores altos, o que pode justificar o baixo desempenho destas amostras. Segundo Liu, Garrett, & Baker (2003) a baixa fertilidade parece estar mais associada a uma menor proporção de espermatozoides que possuem capacidade de fecundar o oócito do que uma diminuição desta capacidade em todos os espermatozoides.

Em contrapartida, no grupo de melhor desempenho reprodutivo (MAIOR), os resultados indicaram que a maior proporção de espermatozoides estava presente na SBP3, com padrão hiperativado, corroborando com estudo realizado recentemente em bovinos, em que touros com maiores porcentagens da subpopulação composta por espermatozoides com movimentos rápidos e não lineares, específicos para espermatozoides hiperativados, apresentaram maior capacidade de fertilização (Ibanescu, Siuda, & Bollwein, 2020). A cinética das células hiperativadas é caracterizada por movimento vigoroso, não linear com alta amplitude e batimento flagelar assimétrico que permite a penetração do espermatozoide na zona pelúcida (Ho et al., 2002; Kathiravan, Kalatharan, Karthikeya, Regarajan, & Kadirvel, 2011) e identificada por altos valores de VCL e ALH juntamente com baixo valor de LIN (Muiño, Tamargo, et al., 2008b; Shojaei et al., 2012). Em contraste com os resultados do presente estudo, em garanhões (Quintero-Moreno et al., 2003), touros holandês (Ferraz et al., 2014) e carneiros (Yániz et al., 2015) foi observado maiores índices de fertilidade em machos que apresentaram alta porcentagem da subpopulação de espermatozoides rápidos e progressivos.

Além destes parâmetros, o valor de Dance (DNC) é utilizado por alguns autores para determinar a motilidade hiperativada em espermatozoides em comparação com outros dentro de uma população (Holt, O'Brien, & Abaigar, 2007). Os valores mais altos de DNC observados na SBP3 no grupo MAIOR é compatível com os valores mais altos de VCL e ALH e valores baixos de LIN, que caracterizam a hiperativação espermática. Estes resultados são sugestivos de cinética de hiperativação, embora não haja consenso sobre os valores destes parâmetros que caracterizam este tipo de cinética espermática na espécie bovina, sendo encontrados valores divergentes na literatura (Shojaei et al., 2012; Van Der Horst, 2014; Kanno et al., 2017; Mondal, Takagi, & Baba, 2017).

Apesar da dificuldade em se padronizar a hiperatividade da célula espermática, de acordo com o presente estudo, é possível que esta avaliação possa ser utilizada para diferenciar touros com menor ou maior desempenho na IATF, corroborando com outros estudos que por meio da avaliação *in vitro*, observaram que a cinética de hiperativação apresentou associação com a superioridade no desempenho reprodutivo em bovinos (Murase et al., 2010; Van Der Horst, 2014). Além disso, quando considerado fertilidade à campo, estudo recente utilizando doses hiperativadas e não hiperativadas de touros, revelaram maiores taxas de gestação por IA com sêmen hiperativado em vacas com ovulação precoce (Pfeifer, Oliveira Júnior & Potiens, 2019), reforçando assim, que o VCL, ALH e LIN são variáveis úteis para a caracterização da hiperativação espermática em touros utilizados em programas de IAT.

Sendo assim, uma vez que a motilidade hiperativada é considerada como indicativa de capacitação (Kathiravan, Kalatharan, Karthikeya, Regarajan, & Kadirvel, 2011), pode-se constituir uma nova hipótese, de que os espermatozoides de touros que apresentam superioridade no desempenho da IATF, representado pelas taxas de gestação, apresentam maior percentual de subpopulações que possuem característica hiperativada após a descongelação e, passam pelo processo de capacitação mais rapidamente, trazendo benefícios à fecundação e posterior desenvolvimento embrionário.

5 Conclusão

Este trabalho, apresenta resultados consistentes de que valores mais altos das subpopulações de espermatozoides hiperativados (SBP3) são indicativos de melhor desempenho na IATF. Deste modo, a identificação de subpopulações espermáticas é relevante para selecionar machos que possuam porcentagem maior porcentagem de subpopulações com melhores características para ser utilizado em diferente biotecnologia reprodutiva. Além disso, pode ser considerado como um método efetivo de predição, com a vantagem de utilizar apenas duas ferramentas: o sistema CASA e o procedimento estatístico multivariado.

Conflito de interesse

Os Autores declaram não haver conflito de interesses

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado e ao Médico Veterinário Fábio Lucas Zito de Moraes pelo fornecimento do banco de dados das IATFs e partidas de sêmen dos touros.

Referências

- Ayres, H., Ferreira, R.M., de Souza Torres-Júnior, J.R., Demétrio, C.G.B., de Lima, C.G., Baruselli, P.S., 2009. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. *Livest. Sci.* 123, 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.11.004>
- Barbas, J.P., Leahy, T., Horta, A.E., García-Herreros, M., 2018. Sperm kinematics and subpopulational responses during the cryopreservation process in caprine ejaculates. *Cryobiology* 82, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.03.005>
- Baruselli, P.S., Lima, B., Catussi, C., Elliff, F.M., Batista, E.S., Crepaldi, G.A., 2019. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos, in: *Anais Do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2019)*. Gramado, RS.
- Bergstein-Galan, T.G., Weiss, R.R., Kozicki, L.E., Bicudo, S.D., 2017. Sperm subpopulations in ejaculated sperm and spermatozoa recovered from ovine epididymides up to 48 h after death. *Anim. Reprod. Sci.* 187, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.10.001>
- Bergstein, T.G., Weiss, R.R., Bicudo, S.D., 2014. Bergstein et al._1979.pdf. *Rev. Bras. Reprodução Anim.* 38, 189–194.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), 2013. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal., 3rd ed. Belo Horizonte: CBRA.
- Dorado, J., Alcaráz, L., Duarte, N., Portero, J.M., Acha, D., Hidalgo, M., 2011. Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. *Anim. Reprod. Sci.* 125, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.03.013>
- Dos Santos, G., Tortorella, R.D., Fausto, D.A., 2018. Rentabilidade da monta natural e inseminação artificial em tempo fixo na pecuária de corte. *Rev. IPecege* 4, 28–32. <https://doi.org/10.22167/r.ipecege.2018.1.28>
- Estrada, E., Rivera del Álamo, M.M., Rodríguez-Gil, J.E., Yeste, M., 2017. The addition of reduced glutathione to cryopreservation media induces changes in the structure of motile subpopulations of frozen-thawed boar sperm. *Cryobiology* 78, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.07.002>
- European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)., 1998. Andrology Special Interest Group, in: *Guidelines on the Application of CASA Technology in the Analysis of Spermatozoa*. Human Reproduction, pp. 142–145.
- Ferraz, M.A.M.M., Morató, R., Yeste, M., Arcarons, N., Pena, A.I., Tamargo, C.,

- Hidalgo, C.O., Muiño, R., Mogas, T., 2014. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to invitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology* 81, 1067–1072. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.033>
- Flores, E., Fernández-Novell, J.M., Peña, A., Rodríguez-Gil, J.E., 2009. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. *Theriogenology* 72, 784–797. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.05.013>
- Flores, E., Taberner, E., Rivera, M.M., Peña, A., Rigau, T., Miró, J., Rodríguez-Gil, J.E., 2008. Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. *Theriogenology* 70, 936–945. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.056>
- Gallego, V., Cavalcante, S.S., Fujimoto, R.Y., Carneiro, P.C.F., Azevedo, H.C., Maria, A.N., 2017. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Theriogenology* 87, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.001>
- García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Ramón, M., Del Olmo, E., Jiménez-Rabadán, P., Fernández-Santos, M.R., Anel-López, L., Garde, J.J., Soler, A.J., 2014. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support in vitro capacitation and fertilisation. *Reprod. Fertil. Dev.* 26, 725–732. <https://doi.org/10.1071/RD13034>
- Garner, D., Pinkel, D., Johson, L., Pace, M., 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.* 34, 127–138.
- Gutiérrez-Reinoso, M., García-Herreros, M., 2016. Normozoospermic versus teratozoospermic domestic cats: Differential testicular volume, sperm morphometry, and subpopulation structure during epididymal maturation. *Asian J. Androl.* 18, 871–878. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187583>
- Ho, H., Granish, K.A., Suarez, S.S., 2002. Hyperactivated Motility of Bull Sperm Is Triggered at the Axoneme by Ca^{2+} and Not cAMP. *Development* 129, 208–217. <https://doi.org/10.1006/2002.dbio.2002.0797>
- Holt, W.V.A., O'Brien, J.B., Abaigar, T.C., 2007. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research 709–718.
- Ibanescu, I., Siuda, M., Bollwein, H., 2020. Motile sperm subpopulation in bull semen using different clustering approaches - Associations with flow cytometric sperm characteristics and fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 215, 206319. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106319>
- Inanç, M.E., Çil, B., Tekin, K., Alemdar, H., Daşkin, A., 2018. The combination of CASA kinetic parameters and fluorescein staining as a fertility tool in cryopreserved bull semen. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 42, 452–458. <https://doi.org/10.3906/vet-1801-83>
- Januškauskas, A., Žilinskas, H., 2002. Bull Semen Evaluation Post-Thaw and Relation of Semen Characteristics To Bull ' S Fertility. *Bulių Spermų Kokybės Įvertinimas Po Atšildymo Bei Spermų Kokybės* 17.
- Kanno, C., Sakamoto, K.Q., Ynagawa, Y., Takahashi, Y., Katagiri, S., Nagano, M., 2017. Comparison of sperm subpopulation structures in first and second ejaculated semen from Japanese black bulls by a cluster analysis of sperm motility

- evaluated by a CASA system. *J. Vet. Med. Sci.* 79, 1359–1365.
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., Kadirvel, G., 2011. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System - A Review. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 165–172. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x>
- Liu, D.Y., Garrett, C., Baker, H.W.G., 2003. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes 18. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg456>
- Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Alvarez, M., Herraes, P., Anel, L., de Paz, P., 2005. Sperm Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm and Their Changes Through the Cryopreservation Process1. *Biol. Reprod.* 72, 316–327. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.032730>
- Mondal, A., Takagi, Y., Baba, S.A., 2017. Possible ability of bovine follicular fluid to attract migrating bull spermatozoa 133–138. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12025>
- Muiño, R., Peña, A.I., Rodríguez, A., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., 2009. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology* 72, 860–868. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.009>
- Muiño, R., Rivera, M.M., Rigau, T., Rodriguez-Gil, J.E., Peña, A.I., 2008a. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Anim. Reprod. Sci.* 109, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.028>
- Muiño, R., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Peña, A.I., 2008b. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Anim. Reprod. Sci.* 109, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.10.007>
- Murase, T., El-Kon, I., Harayama, H., Mukoujima, K., Takasu, M., Sakai, K., 2010. Hyperactivated motility of frozen-thawed spermatozoa from fertile and subfertile Japanese Black bulls induced by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate analogue, cBiMPS. *J. Reprod. Dev.* 56, 36–40.
- Nagy, Á., Polichronopoulos, T., Gáspárdy, A., Solti, L., Cseh, S., 2015. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Vet. Hung.* 63, 370–381. <https://doi.org/10.1556/004.2015.035>
- Núñez-Martínez, I., Moran, J.M., Peña, F.J., 2006. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: Changes after cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* 41, 408–415. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00685.x>
- Oliveira, L., Arruda, R., Celeghini, E.C.C., Andrade, A., Perini, A., Resende, M., Miguel, M., Lucio, A., Hossepian de Lima, V., 2012. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. *Andrologia* 44, 9–15.
- Pfeifer, L.F.M, Oliveira Júnior, J.S, Potiens, J.R., 2019. Effect of sperm kinematics and size of follicle at ovulation on pregnancy rate after timed AI of beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* 201, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.12.009>
- Peña, A.I., Barrio, M., Becerra, J.J., Quintela, L.A., Herradón, P.G., 2012. Motile sperm subpopulations in frozen-thawed dog semen: Changes after incubation in capacitating conditions and relationship with sperm survival after osmotic stress. *Anim. Reprod. Sci.* 133, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.06.016>

- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Teresa Rigau, A., Rodríguez-Gil, J.E., 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59, 1973–1990. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01297-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01297-9)
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2007. Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 312–319. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00785.x>
- R Core Team, 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rahman, M.B., Schellander, K., Luceño, N.L., Van Soom, A., 2018. Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. *Theriogenology* 113, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.012>
- Sá Filho, O.G., Meneghetti, M., Peres, R.F.G., Lamb, G.C., Vasconcelos, J.L.M., 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology* 72, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.008>
- Santolaria, P., Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Fantova, E., Blasco, M.E., Silvestre, M.A., Yániz, J.L., 2015. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 163, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.10.001>
- Severo, N.C., 2009. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. *A Hora Veterinária* 28, 36–39.
- Shojaei, H., Kroetsch, T., Wilde, R., Blondin, P., Kastelic, J.P., Thundathil, J.C., 2012. Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. *Theriogenology* 77, 940–951. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.026>
- Singh, N., Cheema, R.S., Kumar, A., Kaur, M., Dhaliwal, G.S., 2016. Detrimental Impact of Cryopreservation on Buffalo Bull Sperm Motility, Viability and Membrane Integrity Due To Efflux of Membrane Cholesterol 37, 50–51.
- Souza, A.K., Trautwein, L.G.C., Paranzini, C.S., Perencin, F.M., Cardoso, G.S., Martins, M.I.M., 2018. Influence of cooling temperature in sperm subpopulations of domestic cats. *Anim. Reprod. Sci.* 189, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.015>
- Sudano, M.J., Crespilho, A.M.I., Fernandes, C.B., Junior, A.M., Papa, F.O., Rodrigues, J., MacHado, R., Landim-Alvarenga, F.D.C., 2011. Use of bayesian inference to correlate in vitro embryo production and in vivo fertility in Zebu Bulls. *Vet. Med. Int.* 2011, 10–12. <https://doi.org/10.4061/2011/436381>
- Tanghe, S., Van Soom, A., Sterckx, V., Maes, D., De Kruif, A., 2002. Assessment of different sperm quality parameters to predict in vitro fertility of bulls. *Reprod. Domest. Anim.* 37, 127–132. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00343.x>
- Tartaglione, C.M., Ritta, M.N., 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 62, 1245–1252. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.012>
- Van Der Horst, G., 2014. Sperm motility subpopulations and fertility, in: 25th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction. p. 74.
- Vázquez, A.J.F., Cedillo, M.J., Quezada, V.J., Rivas, A.C., Morales, E.C.L., Ayala, E.M.E., Hernández, M.J., González, R.A., Aragón, M.A., 2015. Effects of repeated electroejaculations on kinematic sperm subpopulations and quality markers of

- Mexican creole goats. *Anim. Reprod. Sci.* 154, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.12.009>
- Yániz, J.L., Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Sánchez-Nadal, J.A., Santolaria, P., 2015. Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Anim. Reprod. Sci.* 156, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.03.012>

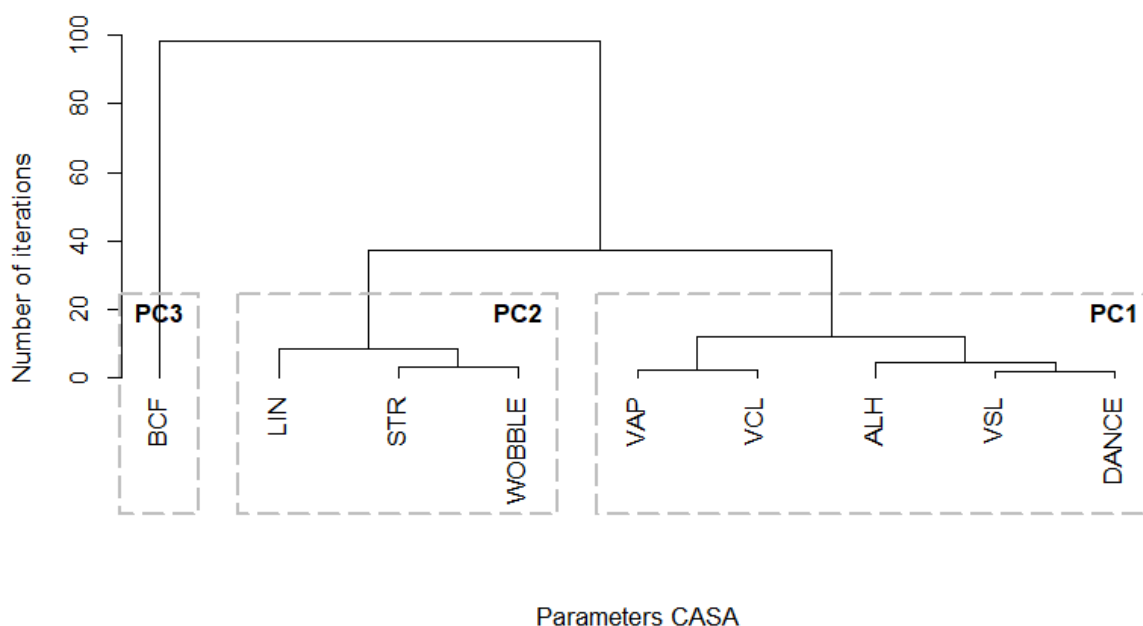


Figura1- Dendrograma obtido pela análise de sêmen descongelado de touros Nelore e Angus, utilizando os parâmetros cinéticos espermáticos extraídos do *software* EDIT/SORT do sistema CASA, resumindo a existência de três componentes principais (PC1; PC2 e PC3).

VAP- Velocidade de trajeto; VSL- Velocidade progressiva; VCL- Velocidade curvilinear; ALH- Amplitude lateral da cabeça; BCF- Frequência de batimento de cauda; STR- Retilinearidade; LIN- Linearidade; WOB- Wobble= $(VAP/VCL) \times 100$; DNC- Dance= $VCL \times ALH$

Tabela 1- Parâmetros de concentração, morfologia espermática e integridade de membrana plasmática de partidas de sêmen descongeladas de touros Nelore e Angus, avaliados em microscopia óptica, agrupadas por grupos de MENOR E MAIOR fertilidade (média \pm erro padrão).

PARÂMETROS	TOUROS		p
	MENOR	MAIOR	
[] x 10 ⁶	16,75 \pm 2,39	20,45 \pm 1,48	0,202
Defeitos Maiores (%)	6,75 \pm 0,88	5,91 \pm 1,40	0,620
Defeitos Menores (%)	12,25 \pm 2,10	12,08 \pm 1,92	0,954
Defeitos Totais (%)	19 \pm 2,54	17,91 \pm 2,04	0,743
Integridade de Membrana (%)	78,83 \pm 0,89	83,25 \pm 1,80	0,039

Tabela 2- Parâmetros de cinética espermática de partidas de sêmen descongeladas de touros Nelore e Angus, avaliados pelo sistema CASA, agrupadas por grupos de MENOR e MAIOR fertilidade (média \pm erro padrão).

PARÂMETROS	TOUROS		p
	MENOR	MAIOR	
MT (%)	51,50 \pm 3,32	73,08 \pm 1,27	0,001
MP (%)	29,33 \pm 2,33	32,33 \pm 2,41	0,007
VAP ($\mu\text{m/s}$)	94,70 \pm 5,96	85,03 \pm 4,70	0,216
VSL ($\mu\text{m/s}$)	70,85 \pm 3,62	63,61 \pm 1,35	0,175
VCL ($\mu\text{m/s}$)	164,28 \pm 13,42	146,19 \pm 11,54	0,318
ALH (μm)	6,88 \pm 0,50	6,49 \pm 0,44	0,566
BCF (Hz)	29,72 \pm 1,46	32,35 \pm 1,52	0,227
STR (%)	76,75 \pm 2,73	77 \pm 2,41	0,946
LIN (%)	47,83 \pm 3,07	47,91 \pm 2,69	0,984
WOBBLE (%)	58,94 \pm 1,72	59,31 \pm 1,51	0,876
DNC (μm^2)	1201,26 \pm 163,44	1002,86 \pm 149,24	0,380
RAPID (%)	43,08 \pm 3,31	57,83 \pm 2,47	0,002
MEDIUM (%)	8,5 \pm 1,13	15,41 \pm 1,96	0,006
SLOW (%)	21,41 \pm 2,13	20,58 \pm 1,21	0,737
STATIC (%)	27,33 \pm 5,14	6,41 \pm 0,82	0,001

MT- Motilidade Total; MP- Motilidade Progressiva; VAP- velocidade do trajeto; VSL- velocidade progressiva; VCL- velocidade curvilinear; ALH- amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF- frequência de batimento flagelar; STR- retilinearidade; LIN- linearidade; WOB- wobble (VAP/VCL) x 100; DANCE- VCL X ALH; Rapid- Espermatozoides com velocidade rápida, Medium- Espermatozoides com velocidade média; Slow- Espermatozoides com velocidade lenta; Static- Espermatozoides estáticos.

Tabela 3- Caracterização das subpopulações espermáticas do sêmen descongelado de touros Nelore e Angus, baseado nos movimentos e parâmetros cinéticos espermáticos.

SUBPOPULAÇÕES	CARACTERÍSTICAS DOS MOVIMENTOS ESPERMÁTICOS	CARACTERÍSTICAS DOS PARÂMETROS CINÉTICOS
1- Rápidos e Progressivos	Espermatozoides rápidos, progressivos, lineares e com baixa oscilação	- VAP, VSL, VCL, ALH, STR, LIN, WOB e DANCE apresentam valores altos
2- Lentos e Progressivos	Espermatozoides lentos, porém, progressivos e lineares com trajetória de baixa sinuosidade	- VAP, VCL, ALH e DANCE apresentam valores baixos STR, LIN e WOB com valores altos
3- Hiperativados	Espermatozoides hiperativados, sinuosos com baixa linearidade	- VAP, VSL, VCL, ALH e DANCE apresentam valores altos - LIN com valores baixos
4- Lentos e sinuosos	Espermatozoides lentos com baixa progressividade, baixa linearidade e alta oscilação	- VAP, VCL, STR e LIN com valores baixos - BCF com valores altos

VAP- velocidade do trajeto; VSL- velocidade progressiva; VCL- velocidade curvilínea; ALH- amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF- frequência de batimento flagelar; STR- retilinearidade; LIN- linearidade; WOB- wobble (VAP/VCL) x 100; DANCE- VCL X ALH.

Tabela 4- Número (n) e percentual de espermatozoides (%) distribuídos em cada subpopulação (total de 16,484 espermatozoides) e parâmetros de cinética espermática, determinados pelo sistema CASA e *software* EDIT/SORT, que caracterizam as subpopulações espermáticas de touros Nelore e Angus, com menor fertilidade (MENOR) após a descongelação.

PARÂMETRO	SUBPOPULAÇÃO			
	1	2	3	4
n	1985	6834	4577	3088
%	12,04	41,46	27,77	18,73
VAP($\mu\text{m/s}$)	119,86 ^b	32,79 ^d	158,34 ^a	67,95 ^c
VSL($\mu\text{m/s}$)	65,76 ^b	15,47 ^d	135,38 ^a	59,77 ^c
VCL($\mu\text{m/s}$)	241,08 ^b	77,02 ^d	248,86 ^a	104,69 ^c
ALH(μm)	12,36 ^a	4,78 ^c	9,36 ^b	4,62 ^d
BCF(Hz)	26,73 ^c	39,41 ^a	24,63 ^d	27,98 ^b
STR(%)	55,91 ^c	49,92 ^d	85,98 ^b	88,03 ^a
LIN(%)	27,75 ^c	21,13 ^d	55,25 ^b	58,41 ^a
WOBBLE(%)	49,98 ^c	42,49 ^d	64,00 ^a	65,91 ^a
DANCE(μm^2)	3035,22 ^a	442,98 ^d	2389,53 ^b	555,72 ^c

* Médias seguidas de letras diferentes, diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

VAP- velocidade do trajeto; VSL- velocidade progressiva; VCL- velocidade curvilínea; ALH- amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF- frequência de batimento flagelar; STR- retilinearidade; LIN- linearidade; WOB- wobble (VAP/VCL) x 100; DANCE- VCL X ALH.

Tabela 5- Número (n) e percentual de espermatozoides (%) distribuídos em cada subpopulação (total de 22.346 espermatozoides) e parâmetros de cinética espermática, determinados pelo sistema CASA e *software* EDIT/SORT, que caracterizam as subpopulações espermáticas de touros Nelore e Angus, com maior fertilidade (MAIOR) após a descongelação.

PARÂMETRO	SUBPOPULAÇÃO			
	1	2	3	4
n	4130	7195	8306	2715
%	18,48	32,20	37,17	12,15
VAP($\mu\text{m/s}$)	56,63 ^c	36,34 ^d	131,02 ^a	114,66 ^b
VSL($\mu\text{m/s}$)	51,28 ^c	18,36 ^d	70,57 ^b	97,55 ^a
VCL($\mu\text{m/s}$)	84,28,04 ^c	81,65 ^d	257,21 ^a	184,09 ^b
ALH(μm)	3,59 ^d	4,91 ^c	13,05 ^a	7,72 ^b
BCF(Hz)	34,90 ^b	39,84 ^a	25,02 ^d	27,16 ^c
STR(%)	90,41 ^a	53,26 ^c	53,78 ^c	84,41 ^b
LIN(%)	61,52 ^a	23,36 ^d	27,21 ^c	52,97 ^b
WOBBLE(%)	67,74 ^a	44,06 ^d	50,86 ^c	62,40 ^b
DANCE(μm^2)	335,81 ^d	481,13 ^c	3400,91 ^a	1440,78 ^b

*Médias seguidas de letras diferentes, diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

VAP- velocidade do trajeto; VSL- velocidade progressiva; VCL- velocidade curvilínea; ALH- amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF- frequência de batimento flagelar; STR- retilinearidade; LIN- linearidade; WOB- wobble (VAP/VCL) x 100; DANCE- VCL X ALH.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando em consideração que na literatura ainda são escassos os estudos que avaliam as correlações das características cinéticas e qualidade do sêmen com os resultados à campo, este estudo surge como um novo método para incrementar a pesquisa dos parâmetros espermáticos preditivos da fertilidade de sêmen pós-congelação na inseminação artificial em tempo fixo em bovinos.

O impacto do sêmen sobre a fertilidade continua sendo de interesse e as pesquisas em torno deste assunto são necessárias para compreender melhor as limitações que ainda existem na reprodução. Neste estudo, apesar de consideramos que existem fatores inerentes à fêmea, manejo nutricional, raça e o inseminador que podem influenciar o sucesso do protocolo da IATF, foi verificado que a qualidade espermática determina o potencial de fertilidade. Assim, o uso de sêmen de maior qualidade melhora os resultados de taxa de gestação dentro de um programa de IATF. Portanto, para alcançar bons índices reprodutivos, é imprescindível o emprego de técnicas que consigam selecionar de forma mais acurada o potencial do touro. Quando se associam mais técnicas de avaliação espermática se obtém melhor predição do potencial de fertilidade de uma partida de sêmen, tornando possível identificar danos sutis do espermatozoide que não foram detectados pelas análises convencionais.

Além disso, a avaliação das subpopulações mostrou dados relevantes sobre a heterogeneidade de populações espermáticas com diferentes potenciais de fertilidade. Assim, sugere-se que populações específicas no ejaculado interferem no processo de fecundação e possivelmente também no desenvolvimento embrionário.