

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

RAFAELA TALINI

**TESTES DE TERMORESISTÊNCIA DO SÊMEN BOVINO E SUA
CORRELAÇÃO COM AS TAXAS DE PREENHIZ APÓS A INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO**

(Bovine Semen Thermoresistance Tests and Its Correlation with the Pregnancy
Rate After Fixed – Time Artificial Insemination)

CURITIBA

2018

RAFAELA TALINI

**TESTES DE TERMORESISTÊNCIA DO SÊMEN BOVINO E SUA
CORRELAÇÃO COM AS TAXAS DE PREENHEZ APÓS A INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO**

(Bovine Semen Thermoresistance Tests and Its Correlation with the Pregnancy
Rate After Fixed – Time Artificial Insemination)

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, área de
concentração Saúde, Tecnologia e
Produção Animal, da Escola de
Ciências da Vida da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná,
para obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ernandes
Kozicki

CURITIBA

2018

**ATA Nº 0120 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA RAFAELA TALINI**

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezoito, às 13 horas e 30 minutos, realizou-se na sala de vídeo 01, térreo, Bloco Verde, Escola de Ciências da Vida, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa da dissertação da mestranda Rafaela Talini, intitulada: “**TESTES DE TERMORESISTÊNCIA DO SÊMEN BOVINO E SUA CORRELAÇÃO COM AS TAXAS DE PRENHEZ APÓS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO**”. A mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Luiz Ernandes Kozicki (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Romildo Romualdo Weiss (UFPR) e Pietro Sampaio Baruselli (USP). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua argüição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada APROVADA.

Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki (Presidente)

Assinatura _____

Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss (UFPR)

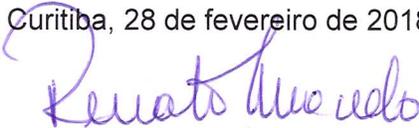
Assinatura _____

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli (USP)

Assinatura _____

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 28 de fevereiro de 2018.



Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal



Caroline Nocera Bertton
Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	vi
AGRADECIMENTOS.....	vii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	viii
RESUMO GERAL.....	ix
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO.....	1
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO.....	1
1.2 A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA) E A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)	2
1.3 DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN.....	2
1.4 ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO SÊMEN.....	3
1.5 INFLUÊNCIA DA MOTILIDADE NA FERTILIDADE DO SÊMEN.....	5
1.6 TESTES DE TERMORESISTÊNCIA DO SÊMEN.....	6
1.7 OBJETIVOS DO TRABALHO.....	7
CAPÍTULO 2.....	8
ARTIGO (A MOTILIDADE OBJETIVA DO SÊMEN E SUA RELAÇÃO COM AS TAXAS DE PREENHEZ EM VACAS DE CORTE MESTIÇAS SUBMETIDAS A UM PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO)	8
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
2.1 ANIMAS.....	11
2.2 PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO.....	11
2.3 ANÁLISE DO SÊMEN.....	12
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4. CONCLUSÃO.....	19
5. REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO 3.....	24
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
REFERÊNCIAS.....	25

ANEXOS.....	29
ANEXO 1. GUIA RESUMIDO PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO PARA A REVISTA THERIOGENOLOGY.....	29
ANEXO 2. PARECER CEUA.....	37

Aos meus pais que sempre se esforçaram
para permitir que eu aproveitasse
todas as oportunidades que me foram
oferecidas e sempre pensaram nas
filhas em primeiro lugar.

Dedicatória

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e incentivo durante todo meu período de estudos.

Ao meu pai Rubens, por ter me ajudado em todos os passos do manejo dos animais. Por ter aceitado a realização do experimento na sua propriedade e por não ter medido esforços para que o trabalho ficasse completo e todos os registros fossem impecáveis.

À minha mãe Josiane, que sempre me incentivou a seguir a profissão dos nossos sonhos.

Às minhas irmãs Carolina e Eloísa, meus maiores modelos de perseverança e dedicação à profissão. Obrigada por serem minhas melhores amigas e me incentivarem a ir sempre em busca de crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador Prof. Luiz Ernandes Kozicki, por todo o conhecimento compartilhado ao longo desses dois anos e pelo aceite da orientação.

Aos professores do PPGCA da PUCPR pelas aulas, pelos conselhos e pelas dicas valiosas para alcançar o sucesso no mundo acadêmico.

Aos colegas do PPGCA, pela companhia e pelos momentos de descontração durante as aulas e permanência na sala dos alunos. Agradeço especialmente a Giovanna e o Luis, que me auxiliaram na realização dos exames laboratoriais deste trabalho.

Ao veterinário Julhomar Santiago, por ter atendido a todos os pedidos de mudanças no protocolo hormonal dos animais, pela paciência na realização de todas as ultrassonografias e pelas explicações detalhadas dispensadas a todas as perguntas que fiz.

Aos empregados da fazenda Sinval, Gabriel, Zeca e Murilo. Pela ajuda no manejo, nem sempre simples, dos animais e pela compreensão da importância do trabalho realizado durante a estação de monta.

Aos meus familiares e amigos que compreenderam minha ausência em vários momentos importantes.

Aos animais, que tornaram esse estudo possível. Tudo que fazemos é para o bem e melhoria da qualidade de vida de vocês.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida durante o mestrado.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução geral, a contextualização do tema, justificativa e os objetivos de estudo. O capítulo 2 trata de artigo científico completo, e formatado nas normas da revista para o qual será submetido. O capítulo 3 finaliza esta dissertação com conclusões gerais, considerações finais e sugestões para estudos futuros. As referências do capítulo 1 encontram-se ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

Para que atividade pecuária seja rentável a reprodução dos animais é de grande importância. Nesse contexto, a Inseminação Artificial (IA) é peça fundamental no âmbito reprodutivo, constituindo-se como uma biotecnologia que otimiza o melhoramento genético do rebanho por meio da aplicação de sêmen congelado. Para solucionar as dificuldades de determinação do momento do estro foi desenvolvida a IA em tempo fixo (IATF), composta por protocolos hormonais que sincronizam o estro e a ovulação de um rebanho. Tanto para a IA quanto para a IATF faz-se necessária a aplicação intrauterina de doses de sêmen dos touros selecionados à reprodução. O sêmen industrializado geralmente é congelado e, em decorrência do processo de criopreservação, sofre danos durante os procedimentos da congelação. A fim de determinar a viabilidade do sêmen após seu descongelamento, alguns testes laboratoriais devem ser executados. Os testes de termoresistência (TT) são realizados nas amostras de sêmen previamente às análises de motilidade, pois representam a exposição do gameta ao ambiente externo, após seu descongelamento. Os TT são uma importante prova e por isso muitos estudos foram realizados objetivando correlacionar os resultados de motilidade desses testes com a fertilidade das amostras a campo. Esses testes podem ser realizados de diversas maneiras, alterando-se o binômio tempo – temperatura. O objetivo deste trabalho foi determinar a correlação entre a motilidade encontrada em diferentes TT, tanto os utilizados como padrão nas Centrais de Inseminação artificial quanto dois testes inéditos, com a taxa de prenhez após a IATF. Dez amostras de sêmen de touros Aberdeen Angus, utilizado em um protocolo de IATF, foram analisadas. Foram realizados TT sob quatro formas diferentes: teste de termoresistência rápido (TTR) – 30 minutos/46°C e testes de termoresistência lentos (TTL) (TTL1 – 60 minutos/38°C; TTL2 – 180 minutos/38°C e TTL3 – 300 minutos/38°C). A motilidade foi determinada por análise computadorizada do sêmen (CASA disponível na internet), com recursos de um microscópio óptico e imagens capturadas por um smartphone. Duzentas e quinze vacas de corte mestiças múltiparas (Nelore x Angus) foram sincronizadas sob um protocolo de IATF. No dia zero (d0) os animais foram submetidos a um implante intravaginal de progesterona + benzoato de estradiol; no d7 prostaglandina F2 alfa; no d8 houve a retirada da P4 + gonadotrofina coriônica equina + cipionato de estradiol e no

d10 executou-se a IATF. Foram checadas as taxas de prenhez (TP) decorridos 30, 60 e 120 dias da inseminação. Os valores médios de motilidade (%) verificados após TT foram: TTR – $19,84 \pm 6,13$; TTL1 – $28,55 \pm 10,48$; TTL2 – $17,62 \pm 5,87$; TTL3 – $8,63 \pm 3,46$. As TP encontradas aos 30, 60 e 120 dias foram 61,86%, 57,67% e 55,81%, respectivamente. As TP foram correlacionadas com os resultados dos TT laboratoriais. Os cálculos para as comparações entre os testes foram realizados via ANOVA e o teste de Tukey, e para as correlações foi utilizada a correlação de Pearson. A correlação entre os resultados dos testes de TT e as TP observadas após a IATF, apresentou-se negativa e significativa ($P < 0,05$) em alguns testes: TTL2 e a TP aos 60 dias ($r = -0,644$; $P = 0,044$) e TTL3 com a TP aos 30, 60 e 120 dias ($r = -0,774$; $-0,752$ e $-0,748$; respectivamente $P = 0,009$; $0,012$ e $0,013$). Conclui-se que os testes de termoresistência, padrões ou não, não constituem parâmetros consistentes para determinar uma correlação positiva entre o desempenho de uma amostra de sêmen in vitro e as taxas de prenhez alcançadas em um programa de IATF.

Palavras-chave: Motilidade espermática, CASA, Taxa de prenhez, Vacas de corte, Teste Termoresistência do Sêmen.

ABSTRACT

In order for livestock to be profitable, the reproduction of animals is of great importance. In this context, Artificial Insemination (AI) is a fundamental piece in the reproductive scope, constituting itself as a biotechnology that optimizes the genetic improvement of the herd through the application of frozen semen. In order to solve the difficulties of determination of the estrous moment, the fixed time AI (FTAI) was developed, composed by hormonal protocols that synchronize estrus and ovulation of a herd. Both AI and FTAI require the intrauterine application of semen doses from bulls selected for breeding. The industrialized semen is generally frozen and as a result of the cryopreservation process it is damaged during the freezing procedures. In order to determine the viability of the semen after its thawing, some laboratory tests should be performed. The thermoresistance tests (TT) are performed on the semen samples prior to the motility analysis, as they represent the exposure of the gamete to the external environment, after its thawing. The TT are important tests and therefore many studies have been carried out to correlate the motility results of these tests with the fertility of the samples on the field. These tests can be performed in several ways by changing the time-temperature binomial. The objective of this work was to determine the correlation between the motility found in different TT, both those used as standard in the Artificial Insemination Centers and two unpublished tests, with the pregnancy rate after the IATF. Ten samples of semen from Aberdeen Angus bulls, used in an IATF protocol, were analyzed. TT were performed in four different ways: rapid thermoresistance test (RTT) – 30 minutes/46°C and slow thermoresistance tests (STT) (STT1 – 60 minutes/38°C; STT2 – 180 minutes/38°C e STT3 – 300 minutes/38°C). Motility was determined by computerized semen analysis (CASA available on the internet), with features of an optical microscope and images captured through a smartphone. Two hundred and fifteen crossbred multiparous cows (Nelore x Angus) were synchronized under a FTAI protocol. On day zero (d0) the animals were submitted to na intravaginal progesterone implant + estradiol benzoate; no d7 prostaglandin F_{2α}; on d8 P4 device was withdrawn + equine chorionic gonadotrophin + estradiol cypionate and in d10 the FTAI was performed. Pregnancy rates (PR) after 30, 60 and 120 days of insemination were checked. The mean values of motility (%) verified after TT were: RTT – 19.84±6.13; STT1 – 28.55±10.48; STT2 –

17.62±5.87; STT3 – 8.63±3.46. The PR found at 30, 60 and 120 days were 61.86%, 57.67% and 55.81%, respectively. The PR were correlated with the results of the laboratory TT. The calculations for the comparisons between the tests were performed using ANOVA and Tukey's test, and Pearson's correlation was used for the correlations. The correlation between the results of the TT tests and the PR observed after the FTAI, was negative and significant ($P < 0.05$) in some tests: STT2 and PR at 60 days ($r = -0.644$, $P = 0.044$) and STT3 with PR at 30, 60 and 120 days ($r = -0.774$, -0.752 and -0.748 , respectively $P = 0.009$, 0.012 and 0.013). It is concluded that standard or non-standard thermoresistance tests are not consistent parameters to determine a positive correlation between the performance of a semen sample *in vitro* and its resulting pregnancy rates in a FTAI program.

Keywords: Sperm Motility, CASA, Pregnancy Rate, Beef Cows, Semen Thermoresistance Test.

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Contextualização

O rebanho bovino brasileiro é o segundo maior do mundo (aproximadamente 225 milhões de cabeças), equivalentes a 22,5% da população bovina mundial (USDA, 2016). A pecuária exerce grande importância na economia brasileira e, por essa razão, aumentar a eficiência reprodutiva dos rebanhos é uma necessidade, uma vez que a reprodução é um dos principais fatores que afetam a rentabilidade da pecuária (Neves et al., 2010). A eficiência do sistema produtivo pode ser alcançada por meio da adoção de manejo assistido dos rebanhos, incluindo-se a Inseminação Artificial (IA) e a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), entre outras (Torres-Junior et al., 2016). Utilizadas em diversas espécies animais, principalmente bovinos, constituem as ferramentas mais importantes em programas de reprodução pois dispensam a presença do macho (Standerholen et al., 2015). A meta da atividade pecuária é associar índices de produção elevados com alta eficiência reprodutiva, a fim de obter maior produtividade e custo-benefício (Cunha et al., 2013).

Nos programas de IA geralmente são utilizadas palhetas de sêmen preservado (resfriado ou congelado), que dispensam a presença física do reprodutor (Arruda et al., 2005). Para isso, o sêmen é diluído em meios que fornecem nutrientes às células e são responsáveis por protegê-las dos procedimentos necessários à sua conservação (Vishwanath e Shannon, 2000).

No processo de criopreservação (congelamento da amostra a temperaturas baixíssimas), os espermatozoides são submetidos a processos extenuantes, conhecidos por causarem danos às membranas plasmáticas das células espermáticas (Hammerstedt et al., 1990; Martin et al., 2004; Arruda et al., 2005). Para assegurar uma fertilidade aceitável, alguns parâmetros como motilidade e morfologia seminal são mensurados em exames pós-descongelamento que auxiliam no controle de qualidade nas Centrais de Industrialização de Sêmen (Vincent et al., 2012).

1.2 A Inseminação Artificial (IA) e a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)

As biotecnologias da reprodução são instrumentos que otimizam, facilitam e incrementam a produção animal, sendo a IA a mais simples, a mais antiga, a de maior impacto e a de menor custo (Neves et al., 2010, Emerick et al., 2011). A IA possui uma função relevante na reprodução animal, especialmente por se tratar do principal meio de disseminação de genes (Severo 2009a). Essa técnica tem sido utilizada em diversas espécies animais e pode ser realizada com sêmen fresco, refrigerado e congelado, constituindo-se uma das ferramentas mais importantes em programas de reprodução (Standerholen et al., 2015). A IA mostrou-se muito útil para a melhoria da genética de rebanhos, da higiene e do controle da reprodução animal, não obstante ainda possua algumas limitações (Gaievski et al., 2015).

A detecção do cio é um dos fatores limitantes do sucesso da IA, além de ser a falha mais onerosa dos programas (Severo, 2009b). Para precisar o momento do estro e aumentar a fertilidade dessa fase é utilizada a IATF (Neves et al., 2010), ferramenta que possibilita superar os desafios relacionados aos longos períodos de estro nas fêmeas e os problemas com a detecção de estro propriamente dita (Martins et al., 2017).

A IATF permite que seja escolhido o melhor momento para a ovulação e a inseminação dos animais, aumentando a produção e a qualidade agregada dos rebanhos (Inforzato et al., 2008). A IATF ainda regula os hormônios do animal, o que permite definir o momento do estro e as datas de fertilização e de parição, otimizando o trabalho a campo (Sá Filho et al., 2010). Essa técnica apresenta como vantagens: empregar um grande número de animais, concentrar o manejo e a data de nascimento dos bezerras, diminuir despesas com mão-de-obra e material, reduzir os gastos com sêmen e a possibilidade do cruzamento entre raças (Inforzato et al., 2008).

O sucesso de programas que envolvem a reprodução assistida, principalmente em bovinos, tem relação direta com a escolha do sêmen, o qual deve ser de boa qualidade (Peixoto e Trigo, 2015; Standerholen et al., 2015).

1.3 Determinação da qualidade do sêmen bovino

Antes de utilizar o sêmen de um reprodutor é necessário saber se ele é fértil, especialmente quando utilizado em um rebanho de fêmeas, para IA (Larsson e

Rodríguez-Martínez, 2000). Para que um espermatozoide seja classificado como viável e fértil é necessário avaliar um conjunto de características que determinam integridade celular e função de seus componentes, sendo essas características a morfologia, o metabolismo e as estruturas celulares (Arruda et al., 2011).

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA – possui um Manual para análise espermática (CBRA, 2013) no qual apresenta valores e características mínimas de parâmetros seminais para que uma amostra seja considerada adequada para a comercialização e o uso na IA (Celeghini et al., 2017). Essa análise é laboratorial e envolve parâmetros como a motilidade progressiva, vigor espermático, motilidade após o teste de termoresistência, defeitos morfológicos menores e maiores e concentração espermática (CBRA, 1998; CBRA, 2013; Celeghini et al., 2017).

As análises realizadas por meio de microscopia óptica, mesmo quando feitas por profissionais treinados e experientes, mostram-se imprecisas, pois há grande variação entre os avaliadores (Arruda et al., 2011). Todavia, técnicas foram desenvolvidas para abandonar a subjetividade das análises (Severo, 2009b). Recentemente, centrais de IA passaram a utilizar a tecnologia da análise computadorizada do sêmen com objetivo de aumentar a objetividade e a qualidade da avaliação do sêmen produzido (Nagy et al., 2015).

Em teoria a análise do sêmen não é complexa, razão pela qual é até considerada banal por muitos veterinários, produtores/criadores e proprietários de touros, o que diminui a atenção dedicada a ela. A obtenção de resultados precisos é dificultada pela falta de treinamento dos analisadores, pela falta de controle de qualidade nos procedimentos de avaliação e pela despadronização desses procedimentos (demonstrada nos diferentes critérios de classificação de amostras nos vários laboratórios de andrologia) (Brito, 2016).

1.4 Análise Computadorizada do Sêmen

Para melhorar a qualidade das pesquisas relativas à fisiologia do espermatozoide era necessária uma forma de obter dados objetivos. Neste cenário, nos anos 40 começou-se a pensar numa forma de obtê-los (Amman e Waberski, 2014). A análise computadorizada do sêmen iniciou-se nos anos 70, e é realizada através de ferramentas como os softwares CASA – Computer-Assisted Sperm Analysis (Vincent et al., 2012; Amann e Waberski, 2014). Esses sistemas CASA funcionam, resumidamente, em três etapas: a projeção

sucessiva de imagens de uma amostra de sêmen em um detector, a detecção de objetos a partir de uma intensidade de pixels e o uso de um software específico para extrair as informações desejadas (Amann e Waberski, 2014).

Os instrumentos básicos que compõem esse sistema são um microscópio, uma câmera digital ou semelhante (para captura de imagens) e um computador com o software especializado para analisar as características dos espermatozoides (movimento, morfologia e concentração) (Verstegen et al., 2002; Vincent et al., 2012; Sellem et al., 2015). Amman e Waberski (2014) enfatizam que os sistemas CASA necessitam vídeos com no mínimo 0,02 segundos, gravados com uma frequência de exposição maior ou igual a 50 frames por segundo.

A tecnologia do CASA tornou-se a maneira mais popular de analisar objetivamente parâmetros espermáticos, e tem adquirido uma importante função na avaliação da qualidade do sêmen, destinado à IA (Vincent et al., 2012; Amann e Waberski, 2014; Sellem et al., 2015). Esses sistemas oferecem, além da vantagem de uma análise objetiva, a verificação precisa de vários parâmetros de movimento e velocidade dos espermatozoides (Verstegen et al., 2002; Vincent et al., 2012; Amann e Waberski, 2014) e a possibilidade de repetibilidade dos resultados (Arruda et al., 2011).

Estão disponíveis no mercado mais de dez sistemas CASA para uso em sêmen de espécies animais (Arruda et al., 2011; Amman e Waberski, 2014). Esses softwares geralmente tem um custo elevado, o que dificulta seu uso em larga escala, principalmente em Centrais e laboratórios de pequeno porte que realizam a análise de sêmen. Wilson – Leedy e Ingermann (2008) descrevem em seu trabalho o desenvolvimento de um CASA de fonte aberta e gratuita, disponível na internet, o que auxiliou a expansão do uso do CASA em vários trabalhos posteriores, em diferentes espécies animais. Diversos trabalhos já foram realizados utilizando essa tecnologia gratuita para a análise do sêmen em mamíferos, validando a aplicabilidade desse *software* (Elsayed et al., 2015; Polo, 2016; Giaretta et al., 2017).

Amann e Waberski (2014) destacam a importância de lembrar que cada espécie animal possui células espermáticas de tamanhos diferentes, com velocidades e padrões de movimento diferentes. Além disso, destacam que softwares distintos produzem resultados diversos quando analisam a mesma amostra, pois, os algoritmos que definem cada programa são diferentes (Amman

e Waberski, 2014; Brito, 2016). Dessa forma, para comparar os resultados de diferentes amostras entre si, é imprescindível analisá-las utilizando o mesmo *software*.

1.5 Influência da motilidade na fertilidade do sêmen

A avaliação da motilidade e suas características (velocidade, progressividade, dentre outras), são uma parte essencial da composição da qualidade do sêmen de diversos mamíferos (Giaretta et al., 2017). A motilidade é um dos parâmetros cruciais a ser avaliado no sêmen, tanto antes quanto depois do congelamento (Rodrigues-Martínez, 2003), pois indica a viabilidade e a integridade do espermatozoide (Nagy et al., 2015).

Para determinar a motilidade, uma alíquota de sêmen é examinada entre lâmina e lamínula, em microscópio óptico, e expressa por meio de porcentagem (%) de células móveis no campo visualizado da amostra (CBRA 1998).

Durante a criopreservação os espermatozoides são submetidos a constantes estresses que influenciam seus movimentos (Hammerstedt et al., 1990; Martin et al., 2004; Arruda et al., 2005; Celeghini et al., 2017). Essa influência ocorre devido a complicações na produção de energia pelas mitocôndrias do espermatozoide, o que resulta na queda da motilidade da célula (Martin et al., 2004), prejudicando seu potencial de fertilizar o óvulo.

Testes *in vitro* são mais rápidos e mais baratos do que os testes a campo (Gill et al., 2000), dessa forma, tem-se grande interesse em encontrar testes laboratoriais para a qualificação do sêmen (Amann, 1989; Zhang et al., 1999;). A relação da motilidade do sêmen bovino, principalmente após descongelamento, com sua fertilidade já foi avaliada em diversos estudos, mostrando a existência de correlação (Dimitropoulos, 1967; Amann, 1989; Farrell et al., 1998; Nagy et al., 2015) e a ausência de correlação (Arruda et al., 1992; Zhang et al., 1999; Graham e Mocé, 2005; Vianna et al., 2009; Emerick et al., 2011; Sellem et al., 2015) entre esses parâmetros.

Autores relatam em suas conclusões que a análise de um só parâmetro (motilidade ou morfologia) não é suficiente para determinar com exatidão a fertilidade de uma amostra (Graham e Mocé, 2005; Kastelic e Thundathil, 2008; Severo, 2009b; Amman e Waberski, 2014; Sellem et al., 2015). São necessários mais estudos visando determinar a relação entre parâmetros independentes

analisados *in vitro* e a fertilidade do sêmen bovino (Amman, 1989; Amman e Wabeski, 2014; Sellem et al., 2015).

1.6 Testes de Termoresistência do sêmen (TT)

O teste de termoresistência (TT) compõe a análise do sêmen após o descongelamento (CBRA, 1998). Inicialmente as amostras são retiradas do botijão de nitrogênio líquido e colocadas para o descongelamento em banho-maria a 37°C – 38°C por 15 (Arruda et al., 1992), 20 (Siqueira et al., 2007) ou 30 segundos (Vianna et al., 2009).

Após o descongelamento é feita a incubação da amostra em banho-maria a 38°C por 5 horas (em tubo de ensaio ou eppendorf®), chamada de Teste de Termoresistência por Dimitropoulos (1967). Após esse tempo, é verificada a motilidade espermática. A fim de acelerar o processo de análise pós-descongelamento, esse mesmo autor desenvolveu uma prova mais rápida (TTR), colocando a amostra em temperatura de 46°C durante 30 minutos. Essas provas tiveram grande aceitação pela comunidade científica, uma vez que o autor conseguiu estabelecer uma correlação positiva entre a motilidade verificada após o teste e a fertilidade obtida a campo (Arruda et al., 1992; Siqueira et al., 2007). Esses testes foram propostos para avaliar a fertilidade potencial das partidas de sêmen congelado bovino e foram posteriormente adaptados para outras espécies (Siqueira et al., 2007).

Os resultados de motilidade após o teste de termoresistência são de grande importância para determinar a qualidade da partida do sêmen e assim possibilitar sua venda. Segundo o CBRA (1998), os resultados de motilidade após os testes de termoresistência devem ser de, no mínimo, 15% para que uma amostra seja qualificada para comercialização.

Diversos trabalhos apresentaram formas diferentes de realizar os TT na tentativa de correlacioná-los com a fertilidade a campo em protocolos de IA. Dimitropoulos (1967) e Vianna et al. (2009) utilizaram os testes de incubação a 38°C por 5 horas e a 46°C por 30 minutos. Já Arruda et al. (1992) aplicaram os mesmos parâmetros para 5 horas e para o teste de 30 minutos deixaram a temperatura em 45°C. Siqueira et al. (2007) incubaram suas amostras por 3 horas a 37°C e Sellem et al. (2015) utilizaram essa mesma temperatura durante 4 horas.

Independentemente do teste utilizado, Amann (1989) reporta que o objetivo a ser alcançado é a determinação da fertilidade de uma amostra a partir de exames laboratoriais.

1.7 Objetivo do Trabalho

O presente estudo teve como objetivo correlacionar a motilidade espermática obtida após testes de termoresistência do sêmen bovino sob diferentes tempos e temperaturas, com a taxa de fertilidade após administração de um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo.

CAPITULO 2

(Artigo científico a ser submetido para publicação no periódico
Theriogenology)

1 **TESTES DE TERMORESISTÊNCIA DO SÊMEN BOVINO E A CORRELAÇÃO**
2 **COM AS TAXAS DE PRENHEZ APÓS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM**
3 **TEMPO FIXO**

4 **BOVINE SEMEN THERMORESISTANCE TESTS AND THE CORRELATION**
5 **TO PREGNANCY RATES AFTER TIMED-ARTIFICIAL INSEMINATION**

6

7 **RESUMO**

8 O estudo objetivou determinar a correlação da motilidade aferida em diferentes
9 Testes de Termoresistência (TT) do sêmen bovino pós-descongelamento com a
10 taxa de prenhez (TP) aos 30, 60 e 120 dias após a inseminação artificial em
11 tempo fixo (IATF). Dez amostras de sêmen de reprodutores da raça Aberdeen
12 angus foram utilizadas na IATF e submetidas a quatro TT: teste de
13 termoresistência rápido (TTR) (30 minutos/46°C) e testes de termoresistência
14 lentos (TTL) TTL1 (60 minutos/38°C); TTL2 (180 minutos/38°C) e TTL3 (300
15 minutos/38°C). Duzentas e quinze fêmeas cruzadas (Nelore X Aberdeen angus)
16 múltiparas foram submetidas ao protocolo de IATF: no dia zero (d0) os animais
17 receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; 0,5g) + benzoato de
18 estradiol IM (BE; 2mg); d7: prostaglandina IM (PGF_{2α}; 500mcg); d8: remoção
19 P4+ gonadotrofina coriônica equina IM (eCG; 400 UI) + cipionato de estradiol IM
20 (CE; 1mg); em d10 foi realizada a IATF. Foram realizados três diagnósticos de
21 gestação (aos 30, 60 e 120 dias) após a IATF. Os percentuais médios de
22 motilidade (%) verificados aos 30, 60, 180 e 300 minutos foram respectivamente:
23 19,84±6,13; 28,55±10,48; 17,62±5,87 e 8,63±3,46 e as TP foram 61,86% (30
24 dias), 57,67% (60 dias) e 55,81% (120 dias). Utilizando o teste de correlação de
25 Pearson nos resultados dos testes e as TP observadas após a IATF, foram
26 constatadas correlações significativas negativas (P < 0,05) entre TTL2 e a TP
27 aos 60 dias (r = -0,644), e entre TTL3 e TP em todos os dias (r = -0,774; -0,752
28 e -0,748). Houve diferença (P < 0,05) entre os valores de motilidade em cada
29 teste. Conclui-se que os testes de termoresistência pós-descongelamento não

30 constituem parâmetros consistentes para determinar a correlação entre a
31 qualidade do sêmen bovino e as taxas de prenhez alcançadas a campo.

32 **Palavras-chave:** Motilidade espermática, CASA, Taxa prenhez, Vacas de corte,
33 Teste termoresistência do sêmen.

34

35 **ABSTRACT**

36 The objective of this study was to determine the correlation of motility measured
37 in different Thermoresistance Tests (TT) of post-thawed bovine semen with
38 pregnancy rate (PR) at 30, 60 and 120 days after artificial insemination at fixed
39 time (FTAI). Ten semen samples from Aberdeen angus breeders were used in
40 the FTAI and submitted to four TT: rapid thermoresistance test (RTT) (30
41 minutes/46°C) and slow thermo-resistance tests (STT) STT1 (60 minutes/38°C);
42 STT2 (180 minutes/38°C) and STT3 (300 minutes/38°C). Two hundred and
43 fifteen crossbred (Nelore X Aberdeen angus) multiparous cows were submitted
44 to an FTAI protocol: on day zero (d0) the animals received an intravaginal
45 progesterone device (P4; 0.5g) + estradiol benzoate IM (BE, 2mg); d7:
46 prostaglandin IM (PGF_{2α}; 500mcg); d8: P4 withdrawal + equine chorionic
47 gonadotrophin IM (eCG; 400 IU) + estradiol IM cypionate (EC; 1mg); on d10 the
48 FTAI was performed. Three gestational diagnoses were performed (at 30, 60 and
49 120 days) after IATF. The mean percentages of motility (%) verified at 30, 60,
50 180 and 300 minutes were respectively: 19.84 ± 6.13; 28.55 ± 10.48; 17.62 ±
51 5.87 and 8.63 ± 3.46 and the PR were 61.86% (30 days), 57.67% (60 days) and
52 55.81% (120 days). Using the Pearson correlation test in the test results and the
53 PR observed after the FTAI, significant negative correlations (P <0.05) were
54 observed between STT2 and PR at 60 days (r = -0.644), and between STT3 and
55 PR in all days (r = -0.774, -0.752 and -0.748). There was a difference (P <0.05)
56 between the motility values in each test. It is concluded that the thermoresistance
57 tests after thawing are not consistent parameters to determine the correlation
58 between the quality of the bovine semen and the pregnancy rates on the field.

59 **Keywords:** Sperm motility, CASA, Pregnancy rate, Beef cows, Semen
60 thermoresistance test.

61

62

63

64

65 1. INTRODUÇÃO

66 A reprodução dos animais coloca-se como um dos fatores que garante a
67 rentabilidade e a continuidade da atividade pecuária. A inseminação artificial (IA)
68 constitui uma biotecnologia não-complicada e de baixo custo, empregada para o
69 melhoramento genético dos rebanhos e para o aumento dos índices reprodutivos
70 [1]. A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) apresenta-se como evolução
71 da IA, por induzir o momento do estro e da ovulação de forma sincronizada (fator
72 limitante no sucesso da IA), a partir da regulação hormonal dos animais [2].

73 A demanda por sêmen bovino criopreservado de qualidade vem
74 aumentando pela disseminação da IA e da IATF [1]. A análise qualitativa do
75 sêmen, que inclui parâmetros como motilidade, vigor e morfologia espermática
76 dentre outros, é realizada nos laboratórios das Centrais Comerciais de Coleta e
77 Congelação de Sêmen, e é considerada o teste mais importante para estimar a
78 fertilidade do reprodutor [3]. Apesar da simples execução, essa análise muitas
79 vezes é negligenciada e, quando executada, não apresenta padrão e
80 uniformização [3].

81 Para dar suporte à padronização e à acurácia da qualidade, análises
82 computadorizadas do sêmen foram desenvolvidas (Computer-Assisted Sperm
83 Analysis - CASA). Essas análises necessitam de um microscópio, uma câmera
84 digital ou semelhante e um computador com o software especializado. Esses
85 sistemas oferecem objetividade na análise, excluindo o fator subjetivo, passível
86 de imperfeições (treinamento, experiência, variações).

87 Os testes de termoresistência (TT) do sêmen a fresco ou após seu
88 descongelamento são realizados para avaliar a integridade das células
89 espermáticas no momento da IA. Desenvolvidos por Dimitropoulos [4], consistem
90 na incubação da amostra do sêmen descongelado a 38°C por 5 horas (teste
91 lento) ou 46°C durante 30 minutos (teste rápido). O sêmen deve apresentar no
92 mínimo 15% de motilidade após a realização de quaisquer um dos testes para
93 ser considerado de boa qualidade após seu descongelamento, e com ao menos
94 70% de motilidade no sêmen fresco [5].

95 A característica – motilidade do sêmen – apresenta-se como o parâmetro
96 mais utilizado para determinar a qualidade e a viabilidade do sêmen após o
97 descongelamento [6]. Diversas publicações relacionam a motilidade do sêmen
98 *in vitro* com a fertilidade a campo, destacando-se, contudo, acentuadas
99 divergências de resultados. Dimitropoulos, Amann e Farrell et al. [4, 7, 8]

100 verificaram correlações positivas entre a motilidade e a fertilidade a campo,
101 enquanto Arruda et al., Zhang et al., Graham e Mocé, Vianna et al., Emerick et
102 al., Nagy et al. e Sellem et al. [1, 9 -14] afirmam não haver correlação.

103 A hipótese do presente estudo é a de que alterando o TT (tido como padrão),
104 por TT com intervalos de incubação não descritos na literatura, seja possível
105 estabelecer uma correlação positiva entre a motilidade do sêmen e a taxa de
106 prenhez (TP) de animais submetidos à IATF.

107 O presente estudo teve como objetivo correlacionar a motilidade
108 espermática do sêmen bovino pós-descongelamento com a taxa de prenhez
109 após inseminação artificial em tempo fixo, utilizando o teste de termoresistência
110 rápido (TTR – 30 minutos/46°C) e testes de termoresistência lentos (TTL1= 60
111 minutos/38°C; TTL2 – 180 minutos/38°C e TTL3 – 300 minutos/38°C),

112

113 **2. MATERIAIS E MÉTODO**

114 **2.1 Animais**

115 O estudo foi realizado durante a estação de monta 2016/2017 e envolveu
116 215 fêmeas bovinas multíparas de corte cruzadas (Nelore X Aberdeen angus)
117 com bezerros ao pé, provenientes de uma fazenda de cria situada na latitude
118 24°57'21" Sul e longitude 53°27'19" Oeste. As vacas encontravam-se com idade
119 média de 40 meses (30 a 55), peso médio de 447,5kg (313 a 590), escore da
120 condição corporal (ECC) de 3,75 (3,0 a 4,5) (1=magra; 5=gorda [15]) e intervalo
121 entre partos médio de 55 dias (50 a 65). Os animais foram mantidos em sistema
122 de rotação de piquetes, sendo a pastagem composta por *Brachiaria brizantha* e
123 *Cynodon plectostachyus* (no verão), com *Avena sativa* (durante o inverno), além
124 de sal mineral e água *ad libitum*.

125

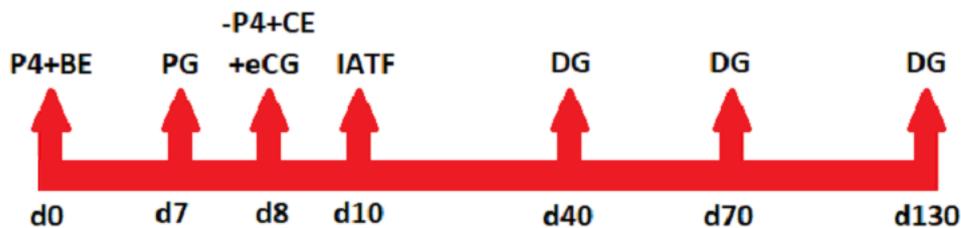
126 **2.2 Protocolo de Sincronização da Ovulação**

127 A sincronização da ovulação seguiu o diagrama do protocolo (Figura 1).
128 Sete dias antes do início da administração do protocolo (d-7) os animais foram
129 submetidos a ultrassonografia dos ovários e útero, a pesagem (Kg) e a definição
130 do escore da condição corporal (ECC; 1= magra, 5= gorda). No dia zero do
131 protocolo (d0) foi inserido um implante intravaginal de progesterona (P4)
132 monodose e administrado 2mg de benzoato de estradiol (BE, IM). No d7 os
133 animais receberam 500 mcg (IM) de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}). No d8, foi
134 retirado o implante de P4 e injetado 400 UI de gonadotrofina coriônica equina

135 (eCG, IM) e 1 mg de cipionato de estradiol (CE, IM). No dia 10 (d10) foi realizada
136 a Inseminação artificial (IATF).

137 Os diagnósticos de prenhez (DP) foram realizados em d40, d70 e d130
138 (correspondente a 30, 60 e 120 dias após a IATF), por ultrassonografia.

139



140

141 Figura 1. Diagrama do protocolo de sincronização da ovulação nas fêmeas bovinas

142 Legenda: P4 – implante de Progesterona (Primer Monodose, 0,5g de progesterona, Agener
143 União Saúde Animal, São Paulo, Brasil); BE – Benzoato de Estradiol (Gonadiol, Zoetis, São
144 Paulo, Brasil); PG – Prostaglandina (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil); CE – Cipionato de
145 Estradiol (E.C.P.®, Pfizer, São Paulo, Brasil); eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina (Novormon,
146 Zoetis, São Paulo, Brasil); IATF – Inseminação artificial em Tempo Fixo; DG – Diagnóstico de
147 Gestação utilizando ultrassonografia transretal.

148

149 A inseminação artificial dos animais foi realizada com sêmen de touros da
150 raça Aberdeen Angus, congelado, proveniente de uma Central de Inseminação
151 Artificial localizada nos Estados Unidos da América. Durante a IA, as partidas do
152 sêmen utilizadas foram escolhidas (retiradas) aleatoriamente do botijão de
153 nitrogênio líquido e os animais eram inseminados na ordem em que entravam no
154 tronco de contenção. Cada partida utilizada teve sua identificação anotada e, ao
155 final da IATF dos 215 animais, duas amostras de cada partida foram separadas
156 para análise da motilidade. Ao todo, dez partidas de três diferentes touros foram
157 utilizadas.

158 Os procedimentos envolvendo ultrassonografia e IA dos animais foram
159 realizados pelo mesmo profissional.

160

161 2.3 Análise de sêmen

162 Uma amostra de cada partida empregada na IA foi analisada em
163 laboratório aplicando-se testes de termoresistência com quatro diferentes
164 tempos: um rápido – TTR (30 minutos a 46°C) e três lentos – TTL1, TTL2 e TTL3
165 (60 minutos, 180 minutos e 300 minutos a 38°C, respectivamente). Os testes

166 TTR e TTL3 são padrões validados [4], enquanto que o TTL1 e o TTL2 são
167 tempos de incubação intermediários do TTL3. Os TTL2 e TTL3 foram escolhidos
168 como combinações alternativas de tempo e temperatura (60 minutos e 180
169 minutos/38°C), em função de escassos estudos de correlação com a TP, muito
170 embora alguns autores [1, 9, 14, 16] tenham trabalhado com tempos e
171 temperaturas diferentes das dos TT padrões.

172 Para o controle da temperatura dos testes, as amostras foram colocadas
173 em banho-maria e individualmente alojadas dentro de tubos de ensaio
174 distribuídos em grades para suporte. Decorridos os intervalos de tempo
175 estipulados, uma alíquota de cada amostra era retirada para avaliação. Todo o
176 material que entrou em contato com o sêmen (lâminas, lamínulas e ponteiros de
177 pipetas) foi aquecido a 37°C, conforme recomendação [5].

178 Seguindo o controle de tempo e temperatura proposto para o estudo, uma
179 alíquota de 10µL de sêmen era colocada entre lâmina e lamínula e levada a um
180 microscópio óptico com luz de LED (Bioptika, modelo B20, Brasil) para análise.
181 A averiguação da motilidade foi feita mediante análise de vídeos de
182 espermatozoides, registrados pela câmera de um smartphone (Samsung Galaxy
183 S5) acoplado à ótica do microscópio com adaptador universal para smartphones,
184 utilizando o plugin CASA do software ImageJ, disponível na internet ([17]
185 *software* disponível online: <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/casa.html>).

186 Foram gravados vídeos de curta duração (4 segundos em média),
187 oriundos de dois campos diferentes de cada amostra para a análise
188 computadorizada da motilidade do sêmen. As configurações utilizadas para
189 gravar o vídeo foram de 59 frames/segundo. Os vídeos foram convertidos para
190 o formato AVI., aceito pelo software, e então analisados utilizando as
191 configurações do plugin indicadas no artigo de Giaretta et al. [18], que discorrem
192 sobre a análise computadorizada do sêmen de mamíferos, combinadas com as
193 configurações dos artigos de Hoflack et al. [19], Sellem et al. [14] e Polo [20]. De
194 cada vídeo foram analisados 30 frames (do 131 a 160), em acordo com a
195 metodologia de Bertol et al. [21] e Sellem et al. [14].

196 Para a leitura dos vídeos sem interferência foi necessário fazer algumas
197 adaptações, no programa ImageJ. O fundo (background) foi removido para evitar
198 que eventuais sujidades ou riscos das lâminas, prejudicassem a leitura e as
199 imagens continham o contraste de cor (chamado de "Threshold") alterado para
200 que os espermatozoides fossem destacados.

201 2.4 *Análise estatística*

202 A análise estatística foi realizada utilizando o *software StatGraphics*
203 (StatPoint Technologies Inc., 2009, The Plains, EUA). O teste de Levene foi
204 utilizado para avaliar a homogeneidade de variância, premissa fundamental para
205 a posterior realização da ANOVA, seguido do teste de Tukey. As análises de
206 variância incluíram efeitos de teste de termoresistência utilizado, amostra e
207 interação entre teste e amostra. A correlação entre a motilidade constatada após
208 os TT e a fertilidade foi verificada utilizando o teste de correlação de Pearson.
209 Para relacionar a taxa de prenhez entre cada uma das partidas foi utilizado o
210 teste Exato de Fisher. Em todas as análises estatísticas foi estabelecida
211 significância de $P < 0,05$.

212

213 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

214 A motilidade é um dos parâmetros mais importantes a ser avaliado [6],
215 não só antes da congelação quanto depois da descongelação do sêmen,
216 principalmente pela sua associação com a capacidade de fertilização do óvulo
217 [22]. A motilidade espermática é indispensável para que as células alcancem o
218 local de fertilização [16], sendo um indicativo da viabilidade e integridade do
219 espermatozoide após a criopreservação e armazenamento sob baixas
220 temperaturas [13].

221 Os dados de motilidade espermática das partidas de sêmen submetidas
222 aos quatro TT bem como as TP aos 30, 60 e 120 dias após a IATF estão
223 dispostos na tabela 1.

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236 Tabela 1 – Dados de motilidade espermática após testes de termoresistência,
 237 número de animais inseminados com cada partida utilizada no estudo e taxas de
 238 prenhez encontradas após cada um dos diagnósticos de gestação realizados
 239 após IATF.

Touro	Partida	Motilidade (%)				Número de Animais Inseminados (n)	Taxa de prenhez (dias) (%)		
		TTR	TTL1	TTL2	TTL3		30	60	120
A	1	19,45	22,45	22,00	5,05	46	69,56 ^a	65,22 ^a	60,87 ^a
	2	34,00	34,05	25,00	13,50	61	57,38 ^{ab}	52,46 ^{ab}	52,46 ^{ab}
	3	18,00	24,10	22,30	8,00	11	63,64 ^{ab}	54,54 ^{ab}	54,54 ^{ab}
	4	10,06	34,50	16,30	9,75	18	61,11 ^{ab}	55,55 ^{ab}	55,55 ^{ab}
B	5	22,80	51,80	24,40	14,40	21	42,86 ^b	38,09 ^b	38,09 ^b
	6	16,80	21,50	15,80	6,30	15	60,00 ^{ab}	53,33 ^{ab}	53,33 ^{ab}
	7	20,0	20,00	16,00	11,50	7	42,86 ^{ab}	42,86 ^{ab}	42,86 ^{ab}
	8	15,60	24,30	16,80	5,70	8	75,00 ^{ab}	75,00 ^{ab}	75,00 ^{ab}
C	9	21,60	35,80	7,22	6,90	12	83,33 ^a	83,33 ^a	75,00 ^a
	10	20,10	17,00	10,40	5,35	16	68,75 ^{ab}	68,75 ^{ab}	62,50 ^{ab}
TOTAL						215	61,86	57,67	55,81

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística de acordo com o teste de correlação de Pearson

Legenda: TTR – Teste Rápido (30 minutos/46°C); TTL1 – Teste Lento (60 minutos/ 38°C); TTL2 – Teste Lento (180 minutos/38°C); TTL3 – Teste Lento (300 minutos/38°C).

A escolha das partidas de sêmen utilizadas na inseminação de cada vaca foi aleatória, por isso o número de animais inseminados com cada partida apresentou disparidade. Contudo esta oscilação na intensidade amostral (número de amostras), não representou problema na execução da análise estatística dos dados, uma vez que essa análise levou em consideração o número de repetições em cada tratamento, que nesse caso são as partidas utilizadas. Um fator importante quando não se tem homogeneidade na intensidade amostral é a homocedasticidade, ou seja, para se realizar os principais testes estatísticos paramétricos (ANOVA e Tukey) as variâncias entre os grupos (partidas) devem ser homogêneas entre si, fato verificado em todos os casos no presente estudo e confirmadas pelo teste de Levene (P=0,05).

Nos TT que utilizam a mesma temperatura e se diferenciam pelo tempo e incubação (TTL1, TTL2 e TTL3), pode-se observar uma relação inversamente proporcional entre o tempo de permanência em banho-maria e a motilidade espermática (Tabela 1). No momento em que a célula espermática recupera suas funções metabólicas após a descongelação, há o início do consumo dos nutrientes do meio de conservação, resultando em metabólitos nesse mesmo meio. Dessa forma, e com o decorrer do tempo, a quantidade de nutrientes disponíveis às células é reduzida, diminuindo conseqüentemente a produção de energia pelas mitocôndrias, responsáveis pela movimentação da cauda do espermatozoide. Os gametas se deterioram com o aumento da duração de seu

265 armazenamento, principalmente pelo estresse oxidativo e a produção de radicais
 266 livres endógenos, prejudicando sua viabilidade [23]. Esse fator justifica a queda
 267 no percentual de motilidade com o passar do tempo após o descongelamento.

268 A temperatura de análise também influencia a motilidade dos
 269 espermatozoides [24]. Segundo Verstegen et al. [25] a temperatura indicada
 270 para a análise do sêmen de animais é 38°C, a mais próxima possível da
 271 temperatura corporal normal. As temperaturas elevadas e/ou os longos períodos
 272 de incubação dos TT refletem negativamente na motilidade do sêmen de bovinos
 273 [12].

274 Os dados do presente estudo demonstraram que o valor de motilidade
 275 média em cada teste é diferente (teste de Tukey). Seguindo a análise, os TT
 276 foram divididos homogeneamente em três grupos, de acordo com seus valores
 277 médios: no primeiro grupo está o TTL3, com as taxas de motilidade mais baixas;
 278 no segundo estão TTR e TTL2, cujas médias não diferem estatisticamente entre
 279 si e, no último grupo está o TTL1, com os valores de motilidade mais elevados
 280 (Tabela 2).

281

282 Tabela 2 – Valor de *r* e de *P* relativos à correlação entre os Testes de
 283 Termoresistência (TT) e as Taxas de Prenhez após a Inseminação Artificial em
 284 Tempo Fixo, em fêmeas *Bos taurus* x *Bos taurus indicus*.

Teste	Motilidade Média (%) ($\bar{x} \pm s$)	Taxa de prenhez (dias)					
		30		60		120	
TT		<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
TTR	19,84 ± 6,13 ^b	-0,186	0,606	-0,158	0,663	-0,208	0,565
TTL1	28,55 ± 10,48 ^c	-0,272	0,447	-0,291	0,415	-0,308	0,386
TTL2	17,62 ± 5,87 ^b	-0,543	0,105	-0,644	0,044	-0,579	0,080
TTL3	8,63 ± 3,46 ^a	-0,774	0,009	-0,752	0,012	-0,748	0,013

285

286

287

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística de acordo com o teste de Tukey.
 Valores de $P < 0,05$ indicam diferença estatística.

288 Utilizando o teste de correlação de Pearson verificou-se correlações
 289 negativas entre alguns TT e a TP após a IATF. O TTL2 apresentou correlação
 290 negativa ($r = -0,644$; $P = 0,044$) com a TP aos 60 dias, ao passo que o TTL3,
 291 (teste padrão de 1967), teve correlação com a TP aos 30, 60 e 120 dias ($r = -$
 292 $0,774$; $-0,752$ e $-0,748$; $P = 0,009$; $0,012$ e $0,013$ respectivamente) (Tabela 2).

293 Esses resultados anulam a hipótese do estudo, uma vez que não foi possível
294 estabelecer nenhuma correlação positiva entre os valores de motilidade nos TT
295 e a TP após IATF.

296 Os achados verificados aqui divergem dos de Dimitropoulos, Amann e
297 Farrell et al. [4, 7, 8], os quais relataram a existência de correlação positiva entre
298 os resultados de motilidade e os da fertilidade de uma determinada amostra de
299 sêmen. No entanto, as correlações negativas observadas aqui corroboram os
300 achados de Emerick et al. [1] ao reportarem correlação de -0,22 entre a
301 motilidade logo após o descongelamento e a taxa de fertilidade, bem como os
302 achados de Vianna et al. [12], citando TP entre 65 e 75% em amostras de sêmen
303 que apresentaram 0% de motilidade nos TT.

304 Emerik et al. [1] justificam que os espermatozoides podem apresentar
305 motilidade elevada, porém não serem férteis, devido a problemas estruturais e a
306 alterações acrossomais, uma vez que mesmo as células com comportamento
307 aparentemente normal podem apresentar algum tipo de comprometimento.

308 Para que o oócito seja fertilizado faz-se necessário apenas um
309 espermatozoide, ou seja, uma célula que apresente motilidade e seja capaz de
310 sobrepujar o meio-ambiente uterino já é suficiente. Quando são analisadas
311 alíquotas de uma amostra, estas podem não ser representativas do
312 comportamento de todas as células que compõem a população, já que a
313 população espermática é heterogênea por natureza [6]. Standerholen et al. [26]
314 reportam resultados conflitantes entre estudos envolvendo a motilidade e a
315 fertilidade em decorrência do grande número de espermatozoides presentes na
316 amostra. Isso pode mascarar os resultados, uma vez que somente uma pequena
317 parte da amostra é avaliada no campo microscópio [16, 26]. Este raciocínio pode
318 ser utilizado para explicar a correlação negativa entre os diversos testes
319 explorados e a fertilidade verificada no presente estudo.

320 A alteração na energia disponível às células também pode justificar o
321 melhor desempenho de amostras que apresentam baixa motilidade no TT. Uma
322 vez que a competição entre as células pelos nutrientes disponíveis no meio é
323 menor (há menos células se movimentando, utilizando esses nutrientes e
324 excretando metabólitos), as poucas células que apresentam motilidade
325 conseguem permanecer móveis por mais tempo e com mais vigor. Isso é
326 diferente de uma amostra com a motilidade acentuada, na qual milhões de

327 espermatozoides competem pelos nutrientes, e dessa maneira se mantêm
328 móveis por menos tempo, com menor intensidade.

329 Fatores intrínsecos do trato genital da fêmea (anatomia, contrações
330 uterinas, deslocamento dos espermatozoides, fatores espermicidas, reações
331 imunológicas dentre outras [27]) também podem influenciar o resultado da IA.
332 Dessa forma, fica claro que uma situação *in vitro* não mimetiza com perfeição as
333 condições e o comportamento da célula espermática *in vivo*.

334 Os achados deste estudo, juntamente com os que já foram descritos na
335 literatura [3, 9, 12], fundamentam que a motilidade encontrada em TT não
336 influencia a fertilidade da amostra. Isso constitui um alerta, de que muitas
337 palhetas de sêmen que poderiam ser utilizadas na IATF e gerar bons resultados
338 estão sendo descartadas por apresentarem motilidade abaixo do mínimo
339 estabelecido para a comercialização (15%).

340 Com relação ao cálculo da motilidade no estudo, o uso do plugin CASA,
341 presente no *software* ImageJ (disponível na internet), possibilitou que as análises
342 (motilidade) pudessem ser realizadas de forma objetiva. As análises foram
343 executadas de acordo com critérios descritos [17-19]. Os vídeos da motilidade
344 seminal foram captados por meio de uma câmera de smartphone, acoplada a
345 um microscópio óptico comum, tornando a análise da motilidade objetiva, de
346 baixo custo e confiável.

347 As diferentes TP verificadas em cada uma das partidas podem ser
348 expressadas pela diferença de qualidade dos ejaculados, incluindo-se os
349 defeitos espermáticos de morfologia. Foram analisadas 10 partidas de sêmen de
350 três touros. Evidenciou-se variações nos resultados de TP, inclusive em partidas
351 diferentes do sêmen de um mesmo animal (Tabela 1).

352 As diferentes partidas de sêmen provêm de ejaculados distintos, gerando
353 por isso características diversas. A qualidade do sêmen varia, uma vez que o
354 processo de produção e maturação dos espermatozoides demora cerca de 60
355 dias [28]. Assim, qualquer exposição a agentes estressantes, (oscilações de
356 temperatura, problemas de origem hormonal ou fármacos, dentre outros), pode
357 alterar a qualidade da célula gerada [29]. Segundo Chenoweth [30] a frequência
358 e a intensidade desses defeitos dependem do tempo e da intensidade da
359 exposição aos agentes estressantes. Esses relatos permitem constatar que as
360 variações na TP de cada uma das partidas estão intimamente ligadas às
361 diferenças morfológicas entre as células que compõem o ejaculado.

362 Segundo Borges et al. [31] a média de TP (Brasil) em vacas à IATF situa-
363 se entre 25 e 70%; portanto, os 55,81% obtidos ao final dos 120 dias do presente
364 estudo (Tabela 1) passam a constituir um desempenho satisfatório após uma
365 sincronização.

366 As fêmeas apresentaram perdas gestacionais de 4,78% entre 30 e 60 dias
367 pós IATF e 1,91% entre 60 e 120 dias, corroborando relatos [32] de que as
368 perdas são mais frequentes os primeiros 35 dias de gestação. Este estudo
369 reforça o fato que as perdas são mais acentuadas entre os 30 e 60 dias após a
370 IATF.

371 Citados por Santos et al. [33] (revisão), Beal et al. [34] e Stevenson et al.
372 [35] relatam perdas entre 6,5 e 10,8% nesse primeiro intervalo entre o DP. Em
373 estudos anteriores foi relatada uma perda de 11,42% após a IATF [33], valor
374 muito superior ao observado neste estudo. As perdas gestacionais no presente
375 estudo são inferiores às descritas na literatura. Sugere-se que esse fato está
376 relacionado com o tipo de manejo dispensado aos animais durante os dias da
377 aplicação do protocolo de IATF. Os animais eram conduzidos e manejados
378 seguindo os preceitos de bem-estar animal. A higiene no momento da realização
379 da IA também pode ser aventada como um fator influente à redução das perdas
380 gestacionais verificadas. Além desses aspectos, o bom ECC e o peso dos
381 animais podem ser arrolados como variáveis ligadas ao bom desempenho
382 reprodutivo encontrado, não obstante as perdas de gestação possam ser
383 influenciadas por imunidade, nutrição, lactação e estresses térmicos dentre
384 outras causas [32].

385 Emerick et al. [1] concluem que nem sempre os testes de rotina são
386 suficientes e eficientes, para determinar a fertilidade de uma amostra, visto que
387 as análises são populacionais e nem todas as células que compõem a amostra
388 possuem os mesmos atributos. Amann [7] destaca a necessidade de um teste
389 laboratorial para determinar a fertilidade de uma amostra ao invés da avaliação
390 de um conjunto de características. Por isso a busca por testes laboratoriais com
391 maior eficácia e relação direta com a fertilidade no campo deve continuar e ser
392 intensificada.

393

394 **4. CONCLUSÕES**

395 Conclui-se que os testes de termoresistência pós-descongelamento não
396 constituem parâmetros consistentes para determinar a qualidade do sêmen

397 bovino e as taxas de prenhez resultantes de seu uso a campo, após
398 administração de IATF. Os testes de termoresistência do sêmen, da forma como
399 são realizados e utilizados atualmente, não traduzem o potencial de fertilidade
400 de uma amostra de sêmen bovino a campo. O percentual mínimo de motilidade
401 instituído para a classificação do sêmen como de “boa qualidade” deve ser
402 revisado. Os dados encontrados mostram a necessidade outros estudos e do
403 desenvolvimento de novas técnicas de testes de sêmen *in vitro* objetivando
404 estabelecer uma correlação positiva com a fertilidade a campo.

405

406 **5. REFERÊNCIAS**

407 [1] Emerick LL, Dias JC, Vale Filho VR, Silva MA, Andrade VJ, Leite TG et al.
408 Avaliação da integridade de membrana em espermatozoide bovino
409 criopreservado para prever o índice de prenhez. Ciênc Anim Bras 2011; 12: 536
410 – 46.

411 [2] Sá Filho MF, Marques MO, Baruselli PS. Indução de ciclicidade e IATF em
412 novilhas zebuínas. Biotecnologia da Reprodução em Bovinos. In: Simpósio
413 Internacional de Reprodução Animal, 4. 2010; Londrina, Brasil. P. 79 – 100.

414 [3] Brito LFC. A multilaboratory study on the variability of bovine semen analysis.
415 Theriogenology 2016; 85: 254 – 66.

416 [4] Dimitropoulos E. La significacion du test de la thermoresistence dans
417 l'appréciation de la valeur fécondante du sperme congele. Ann Med Vet 1967;
418 4: 215 – 24.

419 [5] CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame
420 andrológico e avaliação de sêmen animal. 2nd ed. Belo Horizonte: CBRA; 1998.

421 [6] Rodríguez-Martínez H. Laboratory semen assessment and prediction of
422 fertility: still utopia?. Reprod Domest Anim 2003; 38: 312 – 18.

423 [7] Amann RP. Can the Fertility Potential of a Seminal Sample be Predicted
424 Accurately?. J Androl 1989; 10: 89 – 98.

425 [8] Farrell PB, Presicce DA, Brockett CC, Foote RH. Quantification of bull sperm
426 characteristics measured by computer assisted semen analysis (CASA) and the
427 relationship to fertility. Theriogenology 1998; 49: 871 – 79.

428 [9] Arruda RP, Barnabe VH, Alencar MM de, Barnabe RC. Avaliação de sêmen
429 congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termoresistência: efeitos sobre
430 a fertilidade. Braz J Res Anim Sci 1992; 1: 131 – 37.

431 [10] Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Haard MGH, Rodriguez-Martinez H.
432 Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozen-thawed
433 semen from young dairy bulls entering an AI-programme. *Int J Androl* 1999; 22:
434 253 – 60.

435 [11] Graham JK, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen.
436 *Theriogenology* 2005; 64: 492 – 504.

437 [12] Vianna FP, Papa FO, Zahn FS, Melo CM, Dell’Aqua Jr. JA.
438 Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for
439 cryopreserved bull semen. *Anim Reprod Sci* 2009; 113: 279 – 82.

440 [13] Nagy A, Polichronopoulos T, Gáspárdy A, Solti L, Cseh S. Correlation
441 between bull fertility and sperm velocity parameters generated by computer-
442 assisted semen analysis. *Acta Vet Hung* 2015; 63: 370 – 81.

443 [14] Sellem E, Broekhuijse MLWJ, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L
444 et al. Use of combinations of *in vitro* quality assessments to predict fertility of
445 bovine semen. *Theriogenology* 2015; 84: 1447 – 54.

446 [15] Houghton PL, Lemenager RP, Moss GE. Prediction of postpartum beef
447 cows body composition using weight to height ratio and visual body condition
448 score. *J Anim Sci* 1990; 68: 1428 – 37.

449 [16] Siqueira JB, Guimarães JD, Costa EP da, Henry M, Torres CAA, Silva
450 MVGB da et al. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e
451 testes de avaliação espermática *in vitro*. *Rev Bras Zootec* 2007; 36: 387 – 95.

452 [17] Wilson – Leedy JG, Ingermann RL. Development of a novel CASA system
453 based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility
454 parameters. *Theriogenology* 2007; 67: 661 – 72.

455 [18] Giaretta E, Munerato M, Yeste M, Galeati G, Spinaci M, Tamanini C et al.
456 Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion
457 sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. *Anim Reprod*
458 *Sci* 2017; 176: 11 – 9.

459 [19] Hoflack G, Opsomer G, Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Kruif A et al.
460 Comparison of Computer-assisted Sperm Motility Analysis Parameters in
461 Semen from Belgian Blue and Holstein–Friesian Bulls. *Reprod Domest Anim*
462 2007; 42: 153 – 61.

463 [20] Polo G. Análise Computadorizada (CASA) de Sêmen Equino: Uso do
464 ImageJ com câmera de celular e microscópio óptico. 2016. 58f. Dissertação

465 (Mestrado em Ciência Animal) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
466 Curitiba.

467 [21] Bertol MAF, Weiss RR, Fujita AS, Kozicki LE, Abreu ACMR, Pereira JFS.
468 Dois diluentes comerciais na criopreservação de espermatozoides de
469 epidídimo de touros. *Ciênc Rural* 2014; 44(9): 1658 – 63.

470 [22] Vincent P, Underwood SL, Dolbec C, Bouchard N, Kroetsch T, Blondin P.
471 Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Anim Reprod*
472 2012; 9(3): 153 – 65.

473 [23] Maia MS. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em caprinos. *Acta*
474 *Vet Bras* 2014; 8(2): 389 – 95.

475 [24] Matos DL, Araújo AA, Roberto IG, Toniolli R. Análise computadorizada de
476 espermatozoides: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim* 2008; 32: 225 –
477 32.

478 [25] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen
479 analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002;
480 57: 149 – 79.

481 [26] Standerholen FB, Waterhouse KE, Larsgard AG, Garmo RT, Myromslien
482 FD, Sunde J et al. Use of immobilized cryopreserved bovine semen in a blind
483 artificial insemination trial. *Theriogenology* 2015, 84: 413 – 20.

484 [27] Hawk HW. Transport and Fate of Spermatozoa After Insemination of Cattle.
485 *J Dairy Sci* 1987; 70: 1487 – 503.

486 [28] Romano JE, Brinsko SP. Fisiologia Reprodutiva do Macho. In: Klein BG,
487 editor. *Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária*, Rio de Janeiro: Elsevier;
488 2014, p. 451 – 459.

489 [29] Freneau GE. Aspectos da Morfologia Espermática em touros. *Rev Bras*
490 *Reprod Anim* 2011; 35: 160 – 70.

491 [30] Chenoweth P. Genetics sperm defects. *Theriogenology* 2005; 64: 457 –68.

492 [31] Borges LFK, Ferreira R, Siqueira LC. Sistema para inseminação artificial
493 sem observação de estro em vacas de corte amamentando. *Ciênc Rural* 2008;
494 39(2): 496 – 501.

495 [32] Mello RRC. Perdas Reprodutivas em Fêmeas Bovinas. *ACSA* 2014; 10(4):
496 7 – 23.

497 [33] Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvão KN. The effect
498 of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization
499 programs. *Anim Reprod Sci* 2004; 82–83: 513 – 35.

- 500 [34] Beal WE, Perry RC, Corah LR. The use of ultrasound in monitoring
501 reproductive physiology of beef cattle. *J Anim Sci* 1992; 70: 924 – 29.
- 502 [35] Stevenson JS, Johnson SK, Medina-Britos MA, Richardson-Adams AM,
503 Lamb GC. Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status
504 using estrogen, progesterone, or both. *J Anim Sci* 2003; 81: 1681 – 92.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O advento da análise computadorizada permitiu que as análises feitas em laboratório fossem objetivas, oferecendo valores mais precisos e menor variação de resultados.

Encontrar um teste que elimine a necessidade das análises de taxa de prenhez e desempenho a campo, demoradas e custosas, para determinar a fertilidade de um touro é de grande importância para desenvolver e ampliar a reprodução animal na pecuária. Por esta razão, os estudos envolvendo análise do sêmen devem ser incentivados e desenvolvidos, não somente nos bovinos, mas em todas as espécies animais.

REFERÊNCIAS

1. Amann RP. Can the Fertility Potential of a Seminal Sample be Predicted Accurately?. *J Androl.* 1989; 10: 89 – 98.
2. Amann RP, Waberski D. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA): Capabilities and Potential Developments. *Theriogenology.* 2014; 81: 5 – 17.
3. Arruda RP, Barnabe VH, Alencar MM de, Barnabe RC. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termoresistência: efeitos sobre a fertilidade. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1992; 1: 131 – 37.
4. Arruda RP, Celeghini ECC, Andrade AFC, Garcia AR, Nascimento J, Raphael CF, Souza LWO. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. *Acta Sci Vet.* 2005; 33: 145 – 50.
5. Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaimes JD. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev Bras Reprod Anim.* 2011; 35: 145 – 51.
6. Brito LFC. A multilaboratory study on the variability of bovine sêmen analysis. *Theriogenology.* 2016; 85: 254 – 66.
7. CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte. CBRA, 1998, 49 p.
8. CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013, 104p.
9. Celeghini ECC, Arruda RP, Florez-Rodriguez SA, Santos FB, Alves MBR, Oliveira BMM. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. *Rev Bras Reprod Anim.* 2017; 41: 40 – 5.
10. Cunha RR, Fernandes CAC, Garcia JAD, MM Gioso. Inseminação artificial em tempo fixo em primíparas Nelore lactantes acíclicas. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2013; 65: 1041 – 48.
11. Dimitropoulos E. La significacion du test de la thermoresistence dans l'appréciation de la valeur fécondante du sperme congele. *Ann Med Vet.* 1967; 4: 215 – 24.

12. Elsayed M, El-Sherry TM, Abdelgawad M. Development of a computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J. *Theriogenology*. 2015; 8: 1367 – 77.
13. Emerick LL, Dias JC, Vale Filho VR, Silva MA, Andrade VJ, Leite TG, Martins JAM. Avaliação da integridade de membrana em espermatozoide bovino criopreservado para prever o índice de prenhez. *Ciênc Anim Bras*. 2011; 12: 536 – 46.
14. Farrell PB, Presicce DA, Brockett CC, Foote RH. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer assisted semen analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*. 1998; 49: 871 – 79.
15. Gaievski FR, Lamb GC, Weiss RR, Bertol MAF, Segui MS, Abreu ACMR. Gonadotrophin releasing hormone (GnRH) and equine chorionic gonadotropin (eCG) improve the pregnancy rate on protocols for timed artificial insemination in beef cattle. *Vet e Zootec*. 2015; 22(3): 471 – 80.
16. Giaretta E, Munerato M, Yeste M, Galeati G, Spinaci M, Tamanini C, Mari G, Bucci D. Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. *Anim Reprod Sci*. 2017; 176: 11 – 9.
17. Gill J, Januskauskas A, Haard MCH, Haard MGM, Johanisson A, Söderquist L, Rodriguez-Martínez H. Functional Sperm Parameters and Fertility of Bull Semen Extended in Biociphos-Plus® and Triladyl®. *Reprod Domest Anim*. 2000; 35: 69 – 77.
18. Graham JK, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed sêmen. *Theriogenology*. 2005; 64: 492 – 504.
19. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl*. 1990; 11: 73 – 88.
20. Inforzato G R, Santos W R M dos, Climeni B S O, Dellalibera F L, Filadelpho A. Emprego de iatf (inseminação artificial em tempo fixo) como alternativa na reprodução da pecuária de corte. *Rev Cient Eletrônica Med Vet*. 2008; 11: 1 – 8.
21. Kastelic JP, Thundathil JC. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod Domest Anim*. 2008; 43: 368 – 73.

22. Larsson B, Rodríguez-Martínez H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility?. *Anim Reprod Sci.* 2000; 60-61: 327 – 36.
23. Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod.* 2004; 71: 28 – 37.
24. Martins T, Talamoni JP, Sponchiado M, Maio JRG, Nogueira GP, Pugliesi G. Impacto of estradiol cypionate prior to TAI and progesterone supplementation at initial diestrus on ovarian and fertility responses in beef cows. *Theriogenolgy.* 2017; 104: 156 – 63.
25. Nagy A, Polichronopoulos T, Gáspárdy A, Solti L, Cseh S. Correlation between bull fertility and sperm velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Vet Hung.* 2015; 63: 370 – 81.
26. Neves JP, Miranda KL, Tortorella RD. Progresso científico na primeira década do século XXI. *Rev Bras Zootec.* 2010; 39: 414 – 21.
27. Peixoto KC, Trigo Y. Inseminação Artificial em Tempo Fixo. *Pubvet.* 2015; 9: 45 – 51.
28. Polo G. Análise Computadorizada (CASA) de Sêmen Equino: Uso do ImageJ com câmera de celular e microscópio óptico. 2016. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba.
29. Rodríguez-Martínez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. *Reprod Domest Anim.* 2003; 38: 312 – 18.
30. Sá Filho MF, Marques MO, Baruselli PS. Indução de ciclicidade e IATF em novilhas zebuínas. *Biotechnology da Reprodução em Bovinos (4º Simpósio Internacional de Reprodução Animal) Anais...* Londrina 2010; 79 - 100.
31. Sellem E, Broekhuijse MLWJ, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen EPC. Use of combinations of *in vitro* quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology.* 2015; 84: 1447 – 54.
32. Severo NC. Impacto na Inseminação artificial na indústria bovina no Brasil e no mundo. *Rev V & Z em Minas.* 2009a; 101: 16 – 22.
33. Severo NC. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. *Hora Vet.* 2009b; 167: 36 – 9.
34. Siqueira JB, Guimarães JD, Costa EP da, Henry M, Torres CAA, Silva MVGB da, Silveira TS. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino

- congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. Rev Bras Zootec. 2007; 36: 387 – 95.
35. Standerholen FB, Waterhouse KE, Larsgard AG, Garmo RT, Myromslien FD, Sunde J, Ropstad E, Klinkenberg G, Kommisrud E. Use of immobilized cryopreserved bovine semen in a blind artificial insemination trial. Theriogenology. 2015; 84: 413 – 20.
 36. Torres-Junior JRS, Ribeiro DLS, Pereira HG, França IG. Mitos e verdades em programas de IATF. Rev Bras Reprod Anim. 2016; 40: 129 – 41.
 37. USDA – United States of America Department of Agriculture. <http://www.usda.gov>. 2016.
 38. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology. 2002; 57: 149 – 79.
 39. Vianna FP, Papa FO, Zahn FS, Melo CM, Dell’Aqua Jr JA. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. Anim Reprod Sci. 2009; 113: 279 – 82.
 40. Vincent P, Underwood SL, Dolbec C, Bouchard N, Kroetsch T, Blondin P. Bovine semen quality control in artificial insemination centers. Anim Reprod. 2012; 9(3): 153 – 65.
 41. Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim Reprod Sci. 2000; 62: 23 – 53.
 42. Wilson – Leedy JG, Ingermann RL. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. Theriogenology. 2007; 67: 661 – 72.
 43. Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Haard MGH, Rodriguez-Martinez H. Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. Int J Androl. 1999; 22: 253 – 60.

ANEXO (S)

Anexo 1. Guia resumido para submissão de artigo para a revista Teriogenology

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal crossreferencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts

(avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in

SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle,

variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the

figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plugins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text.

The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010; 163: 51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13.03.03].

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Journal Abbreviation Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

**Anexo 2. Parecer do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
PUCPR.**

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01047/2016 – 01047A/2016 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Testes de termorresistência do sêmen bovino e suas repercussões sobre a taxa de prenhez aos 30, 60 e 120 dias em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo

TÍTULO DO PROJETO ALUNO: Testes de termorresistência do sêmen bovino e suas repercussões sobre a taxa de prenhez aos 30, 60 dias em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Luiz Ernandes Kozicki

EQUIPE DE PESQUISA

Rafaela Talini, Gabriela Napoli Bourguignon Kiers

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO

Escola de Ciências da Vida / Medicina Veterinária

VIGÊNCIA DO PROJETO	09/2016 a 02/2017	QUANTIDADE DE ANIMAIS	300
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Bos taurus</i> (Bovino)	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	Fêmeas	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	36 – 48 meses / 300 a 400 kg	ESPECIÉ – GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Fazenda Comerciais	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado do CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de **15.09.2016**. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório á CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo. **Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a esta CEUA.**

Atenciosamente,

Profa. Dra. Marta Luciane Fischer

Coordenadora

Comissão de Ética no Uso de Animais

