

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Ana Paula Martini

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA FERTILIDADE DO SÊMEN
BOVINO EM PROGRAMAS DE IATF**

Santa Maria, RS
2019

Ana Paula Martini

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA FERTILIDADE DO SÊMEN
BOVINO EM PROGRAMAS DE IATF**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Mara Iolanda Batistella Rubin

Santa Maria, RS
2019

Martini, Ana Paula

Avaliação in vitro e in vivo da fertilidade do sêmen
bovino em programas de IATF / Ana Paula Martini.- 2019.
73 p.; 30 cm

Orientadora: Mara Iolanda batistella Rubin
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2019

1. reprodução 2. bovinos 3. fertilidade I. batistella
Rubin, Mara Iolanda II. Título.

Ana Paula Martini

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA FERTILIDADE DO SÊMEN
BOVINO EM PROGRAMAS DE IATF**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 06 de fevereiro de 2019:

Mara Iolanda Batistella Rubin, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Mari Lourdes Bernardi, Dra. (UFRGS) - Videoconferência

Ricardo Pozzobon, Dr. (UFSM)

Lucas Carvalho Siqueira, Dr. (UNICRUZ)

Lucio Pereira Rauber, Dr. (IFC-Concórdia) - Videoconferência

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meus caminhos até aqui.

À minha família, especialmente aos meus pais, Paulo e Marilene, que me incentivaram a estudar e seguir meus objetivos. Aos meus irmãos Juliana e Filipe, pelo carinho e apoio.

Ao Gilson, meu amigo e companheiro, agradeço pelo amor e sobretudo apoio incondicional.

À minha orientadora Prof^a Mara Iolanda Batistella Rubin, pela orientação ao longo da minha jornada acadêmica: graduação, mestrado e doutorado. Agradeço imensamente pela oportunidade, ensinamentos transmitidos e pelo exemplo que és.

À equipe do Embryolab, aos colegas pós-graduandos e estagiários, pela convivência, amizade e pelos incansáveis dias de campo na realização deste estudo.

Ao Sr. Mario Cezar Dias Onófrío, pela disponibilidade dos animais e estrutura necessária para realização do estudo.

À Prof^a Karin Erica Brass, pela credibilidade em ceder gentilmente a completa estrutura da Cabanha Baviera para a execução do experimento.

À Dra Daniela S. Brum e Dr Fábio Gallas Leivas (Unipampa-Uruguaiana/RS) por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório Biotech e equipamentos para o experimento *in vitro*. Agradeço imensamente as suas orientadas de mestrado, Daniele Missio e Hirya Fernandes Pinto, pelo imensurável auxílio na execução dos testes laboratoriais.

À Alta Genetics – Brasil pela doação do sêmen bovino.

Ao colega PhD Manoel Francisco de Sá Filho pelo suporte científico.

À UFSM e ao PPGMV, pelo ensino e suporte proporcionado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA FERTILIDADE DO SÊMEN BOVINO EM PROGRAMAS DE IATF

AUTORA: Ana Paula Martini

ORIENTADORA: Mara Iolanda Batistella Rubin

A inseminação artificial (IA) é a principal ferramenta para aumentar a produtividade e rentabilidade dos rebanhos bovinos. Programas de IA em tempo fixo (IATF) aumentam o uso da IA, bem como a eficiência reprodutiva de rebanhos de corte. Porém, o sucesso dos programas de IATF é dependente da qualidade do sêmen. Maiores taxas de concepção podem ser obtidas quando touros com bom histórico de fertilidade são utilizados durante a estação reprodutiva. Esta Tese de Doutorado está apresentada sob a forma de dois manuscritos. A pesquisa descrita no *manuscrito 1* mostra a taxa de concepção de fêmeas *Bos taurus taurus* submetidas à IATF com diferentes partidas de sêmen comercial bovino. Além disso, investigou-se a associação da taxa de concepção com dados referentes à manifestação de estro e escore de condição corporal das fêmeas taurinas. O *manuscrito 2* refere-se à influência do momento da IA (48 ou 54 h) após a retirada do implante de progesterona sobre a taxa de concepção em fêmeas inseminadas com sêmen de touros de alta e baixa fertilidade. Adicionalmente, exames laboratoriais de cinética e funcionalidade espermática foram efetuados, após teste de termorresistência e seleção espermática, para investigar a sua associação com a fertilidade *in vivo* de touros de alta e baixa fertilidade. No *manuscrito 1* detectou-se que existe variação individual na fertilidade de touros em programas de IATF com diferença na taxa de concepção com o uso de diferentes partidas de sêmen de um mesmo reprodutor. Além disso, confirmou-se que a manifestação de estro e o escore de condição corporal são dados essenciais que devem ser criteriosamente analisados nos programas de IATF, pois influenciam diretamente nos índices de concepção. Os dados obtidos no *manuscrito 2* ressaltam que a taxa de concepção com touros de baixa fertilidade foi similar à obtida em touros de alta fertilidade quando a inseminação foi atrasada para as 54h pós remoção do dispositivo de progesterona em programas de IATF, isto é, mais próxima à ovulação. Além disso, os parâmetros quantitativos de movimento espermático (VCL, VSL e VAP) determinados pelo método computadorizado após teste de termorresistência foram inferiores em touros de baixa fertilidade em comparação com os touros de alta fertilidade.

Palavras-chave: Touros. IATF. Prenhez. Produção.

ABSTRACT

IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION OF BOVINE SEMEN FERTILITY IN FTAI PROGRAMS

AUTHOR: Ana Paula Martini
ADVISOR: Mara Iolanda Batistella Rubin

Artificial insemination (AI) is mainly applied to increase the productivity and profitability of cattle herds. Fixed-time AI programs (FTAI) increase the use of AI and the reproductive efficiency of herds. However, the success of FTAI programs is dependent on the semen quality, because higher conception rates can be obtained when bulls with good fertility histories are used during the breeding season. This thesis is presented in the form of two manuscripts. The aim of the *manuscript 1* was to evaluate the conception rate of *Bos taurus taurus* females submitted to FTAI with different sets of commercial bovine semen in addition to investigate the association between conception rate and demonstration of estrous and body condition score (BCS) of taurine females. The aim of *the manuscript 2* was to evaluate the influence of the moment of FTAI (48 or 54 h after the progesterone device removal) on the conception rate of high and low fertility bulls. In addition, the association between spermatic kinetics and functionality, after thermoresistance test and sperm selection, with field fertility of bulls previously classified as having high or low fertility was also investigated. The data obtained in the *manuscript 1* demonstrated that there is individual variation in fertility of bulls used in FTAI programs and a difference in conception rate was observed among different sets of semen from the same bull. In addition, it was shown that the demonstration of estrus and BCS are essential data that must be carefully analyzed in the FTAI programs, because low conception rates are observed in females not in estrus or in those with low BCS. The data obtained in the *manuscript 2* emphasized that the conception rate was similar between low and high fertility bulls when the insemination was delayed to 54 h after removal of progesterone device in FTAI programs, i.e. nearest to ovulation. In addition, low fertility bulls present lower quantitative parameters of sperm movement (VCL, VSL and VAP), determined by the computerized method after thermoresistance tests, than high fertility bulls.

Key-words: Bull. FTAI. Pregnancy. Production.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação da estrutura complexa do espermatozoide.....	15
Figura 2 -	Análise computadorizada do movimento espermático bovino visualizado em microscópio óptico acoplado ao sistema computadorizado Sperm Class Analyser. Em vermelho visualiza-se a trajetória dos espermatozoides móveis.....	17
Figura 3 -	Espermatozoides bovinos corados com associação das sondas PI, FITC-PSA e JC-1 sob microscopia de fluorescência. a) Espermatozoide íntegro (membrana plasmática e membrana acrossomal íntegras com alto potencial mitocondrial); b) Espermatozoide com membrana plasmática íntegra, lesão acrossomal com baixo potencial mitocondrial; c) Espermatozoide com membranas plasmática e acrossomal lesadas com baixo potencial mitocondrial.....	19
CAPÍTULO 1		
Figure 1 -	Schematic diagram of inclusion or exclusion of study data.....	37
Figure 2 -	Experimental design. EB = 2 mg of estradiol benzoate; eCG = 300 IU of equine chorionic gonadotropin; ECP = 1 mg of estradiol cypionate; dinoprost = 12.5 mg of dinoprost trometamina; TAI = timed artificial insemination performed 48 h after removal of the progesterone (P4) insert; US = ultrasound examination (pregnancy diagnosis).....	38
CAPÍTULO 2		
Figura 1 -	Experimento <i>in vivo</i> . Desenho experimental. BE = 2 mg de benzoato de estradiol; eCG = 400 UI de gonadotrofina coriônica equina; ECP = 1 mg de cipionato de estradiol; dinoprost = 12.5 mg de dinoprost trometamina; IA = inseminação artificial realizada 48 h (am) ou 54 h (pm) após a remoção do implante intravaginal de progesterona (P4); DG – exame ultrassonográfico para diagnóstico de gestação.....	59
Figura 2 -	Concepção aos 30 dias após IATF de vacas de corte <i>Bos taurus taurus</i> lactantes inseminadas em tempo fixo 48 h ou 54 h após a remoção do implante intravaginal de progesterona com sêmen de alta e baixa fertilidade (P<0.0065).....	60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1 -	Mean of conception rate (\pm standard deviation) in suckled <i>Bos taurus</i> beef cows ($n = 7,737$) inseminated with semen from 13 different bulls.....	39
Table 2 -	Mean of conception rate (\pm standard deviation) in suckled <i>Bos taurus</i> beef cows that demonstrated estrus ($n = 5,069$) and without estrus on the TAI ($n = 2,668$) and inseminated with semen from 13 different bulls.....	40
Table 3 -	Mean of conception rate (\pm standard deviation) in suckled <i>Bos taurus</i> beef cows ($n = 2,062$) that demonstrated estrus and with body condition score ≥ 3 inseminated with semen from 10 different bulls.....	41
Table 4 -	Mean of conception rate (\pm standard deviation) in suckled <i>Bos taurus</i> beef cows ($n = 620$) with body condition score ≥ 3 from the same farm, inseminated with 3 different batches (B1, B2 e B3) from a single bull (Bull B).....	42

CAPÍTULO 2

Tabela 1 -	Análise descritiva de acordo com a distribuição dos grupos de manejo. Informações sobre as vacas taurinas em grupos de manejo, ECC no início do protocolo de IATF, ciclicidade, demonstração de estro no momento da IA e taxa de prenhez.....	61
Tabela 2 -	Média (\pm Desvio Padrão) das características espermáticas de touros <i>Bos taurus taurus</i> avaliadas de forma subjetiva, cinética e funcionalidade espermática nos grupos alta e baixa fertilidade pós descongelamento (0h)....	62
Tabela 3 -	Média (\pm Desvio Padrão) das características espermáticas de touros <i>Bos taurus taurus</i> avaliadas de forma subjetiva, cinética e funcionalidade espermática nos grupos de alta e baixa fertilidade pós TTR fisiológico (TTR) e pós seleção espermática e TTR (P+TTR).....	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	FERTILIDADE E QUALIDADE DO SÊMEN.....	13
2.2	ANÁLISE LABORATORIAL DO SÊMEN.....	14
2.2.1	Análise convencional	14
2.2.2	Análise computadorizada	16
2.2.3	Sondas Fluorescentes	17
2.2.3.1	<i>Avaliação da membrana plasmática</i>	18
2.2.3.2	<i>Avaliação da membrana acrossomal</i>	18
2.2.3.3	<i>Avaliação da funcionalidade mitocondrial</i>	19
2.2.4	Seleção espermática	19
2.2.5	Teste de termorresistência	20
2.3	TESTES LABORATORIAIS E FERTILIDADE <i>IN VIVO</i>	21
2.4	PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO.....	21
3	CAPÍTULO 1	24
4	CAPÍTULO 2	43
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
6	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66
	APÊNDICE A - Resumo publicado no 12º Simpósio Internacional de Reproducción Animal em Cordoba - Argentina em 2017.....	72
	APÊNDICE B - Resumo publicado na 32ª Jornada Acadêmica Integrada da UFSM em 2017.....	73

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de alimento do mundo, entre eles, a carne bovina. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de carne, possui o segundo maior rebanho bovino do mundo e detém a primeira posição por ter o maior rebanho comercial (GOMES et al., 2017). Nesse contexto, um processo de incorporação de tecnologias à pecuária é necessário visando a melhoria dos índices de produtividade e a aceleração do melhoramento genético.

Dentre as estratégias de maior impacto no melhoramento genético, a inseminação artificial (IA) é a principal ferramenta para aumentar a produtividade e rentabilidade dos rebanhos bovinos. Programas de sincronização da ovulação para IA em tempo fixo (IATF) aumentam o uso da IA, bem como a eficiência reprodutiva de rebanhos de corte. Embora já se tenha satisfatória taxa de fertilização com os programas de IATF, mais estudos são necessários para aprimorar os resultados e proporcionar maior conhecimento sobre os fatores que afetam as taxas de concepção em vacas submetidas aos protocolos de IATF (SÁ FILHO et al., 2009).

Múltiplos fatores podem influenciar o sucesso dos programas de sincronização da ovulação para IATF em fêmeas bovinas de corte. Os parâmetros relacionados à fêmea bovina como a condição corporal e a categoria animal têm sido objeto de diversos estudos (PERRY et al., 2007; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009; BARUSELLI et al., 2012). Contudo, a fertilidade bovina é um processo multifatorial que não está somente relacionado à fêmea. O adequado manejo do rebanho, o momento preciso para utilizar a IA e a qualidade do sêmen também estão diretamente relacionados à fertilidade (SELLEM et al., 2015).

As pesquisas relacionadas à qualidade seminal e a fertilidade do macho são escassas (CRESPILHO, 2010). Contudo, estudos para melhorar os resultados relacionados à qualidade do sêmen utilizado nos programas de IATF são necessários para identificar a influência que as características seminais exercem sobre as taxas de concepção dos rebanhos. Além disso, existem poucas informações relacionando testes laboratoriais e resultados obtidos de estudos conduzidos *in vivo*, como a taxa de concepção em touros de alta e baixa fertilidade. Nesse sentido, é de grande importância identificar testes laboratoriais que apresentam alta correlação com os resultados de campo. Assim, com o estabelecimento de associações é possível o desenvolvimento de estratégias específicas para melhoria dos resultados de IATF identificando touros de alta fertilidade que resultam em alto desempenho reprodutivo.

Esta Tese de Doutorado é apresentada na forma de 2 manuscritos. A pesquisa descrita no *manuscrito 1* mostra a taxa de concepção de fêmeas *Bos taurus taurus* submetidas à IATF com diferentes partidas de sêmen comercial bovino. Além disso, demonstra a associação da

taxa de concepção com dados referentes à manifestação de estro e escore de condição corporal das fêmeas taurinas. O *manuscrito 2* refere-se à influência do momento da IA (48 ou 54 h) após a retirada do implante de progesterona sobre a taxa de concepção com uso de sêmen de touros de alta e baixa fertilidade. Adicionalmente, exames laboratoriais de cinética e funcionalidade espermática foram efetuados após teste de termorresistência e seleção espermática para verificar sua associação com a fertilidade *in vivo* de touros de alta e baixa fertilidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O uso da inseminação artificial (IA) apresenta vantagens como a padronização do rebanho, o controle de doenças sexualmente transmissíveis e a diminuição do custo de reposição de touros. Adicionalmente, a IA contribui para o processo de melhoramento genético e obtenção de animais com alto potencial de produção e reprodução. Entretanto, a literatura (PERRY et al., 2007; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009; BARUSELLI et al., 2012) indica que diversos fatores podem influenciar o sucesso dos programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Em bovinos, o sucesso dos programas de IA também é dependente da qualidade do sêmen utilizado, sendo que melhores taxas de concepção podem ser obtidas quando touros com bom histórico de fertilidade são utilizados durante a estação de monta (SUDANO et al., 2011).

2.1. FERTILIDADE E QUALIDADE DO SÊMEN

O termo fertilidade é amplamente definido como a capacidade de produzir descendência viável. Existem vários outros parâmetros de fertilidade entre o momento da inseminação e o nascimento, que incluem a taxa de fertilização, taxa de não retorno ao estro e a taxa de concepção (UTT, 2016). Contudo, a fertilidade bovina é um processo multifatorial que não está somente relacionado à fêmea. Não menos importante, o manejo adequado do rebanho, o momento preciso para utilizar a IA e a qualidade do sêmen também estão diretamente relacionados à fertilidade (SELLEM et al., 2015). No macho, fertilidade é a capacidade de produzir gametas masculinos, ou espermatozoides aptos à realização da fertilização e ao perfeito desenvolvimento embrionário (MORANI et al., 2018).

A busca incansável em melhorar a taxa de concepção dos rebanhos está incluída nas metas de melhoramento em muitos países, porém está associado principalmente aos estudos relacionados com a fertilidade da fêmea bovina. Em contraste, a fertilidade do touro tem recebido restrita consideração. Contudo, a mensuração deste parâmetro nos machos assume relevante influência sobre a eficiência produtiva dos rebanhos (MORANI et al., 2018), uma vez que uma porcentagem significativa de falhas reprodutivas tem sido atribuída aos touros inférteis e subférteis (DEJARNETTE et al., 2004), o que resulta em significativa perda financeira (SELLEM et al., 2015).

A qualidade do sêmen pode variar ao longo da vida reprodutiva do touro e até mesmo touros férteis podem produzir alguns ejaculados com inadequada capacidade fecundante, que

pode ser relacionada à idade ou ambiente em que vivem (BRITO et al., 2002). Por isso, a fertilidade do touro deve ser monitorada por análise laboratorial periódica da qualidade do sêmen e também através de registros de taxa de concepção em programas reprodutivos (SELLEM et al., 2015). Além disso, a estimativa precoce da fertilidade de touros auxilia na produção rentável de sêmen congelado, pois touros jovens que apresentam baixa qualidade seminal ou fertilidade causam perdas financeiras que incluem despesas de criação e preparo para a coleta do sêmen (DHINESH KUMAR et al., 2015).

Garantir a melhor qualidade do sêmen é uma preocupação para as centrais de colheita e processamento do sêmen. Para proporcionar fertilidade satisfatória após a IA, grandes avanços foram efetuados na preservação do sêmen de touros para garantir a fertilidade seminal (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2006; SAACKE, 2008; AL NAIB et al., 2011; VINCENT et al., 2014). Contudo, os procedimentos de congelamento e descongelamento utilizados na rotina das centrais de produção ainda são prejudiciais às membranas dos espermatozoides, pois alteram a organização, fluidez, permeabilidade e composição lipídica das membranas de espermatozoides. A criopreservação do sêmen aumenta a produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO), que são responsáveis por induzir danos ao DNA espermático e causar rápida perda do potencial fertilizante por meio da peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides (BALL et al., 2001). Assim, o processo produz efeito negativo resultando em baixa viabilidade espermática no trato genital feminino (HAMMERSTEDT et al., 1990). Além disso, espermatozoides mortos e com alterações exercem efeitos tóxicos sobre as demais células espermáticas (SHANNON & CURSON, 1972; LINDEMANN et al., 1982).

2.2. ANALISE LABORATORIAL DO SÊMEN

Para efeito de comercialização, o sêmen bovino congelado deve apresentar como características desejáveis no mínimo 30% de motilidade (escala de 0-100%), 3 de vigor (escala de 1-5), 70% de espermatozoides com morfologia normal (0-100%) e 10×10^6 espermatozoides móveis por palheta envasada, conforme as diretrizes do “Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen” do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

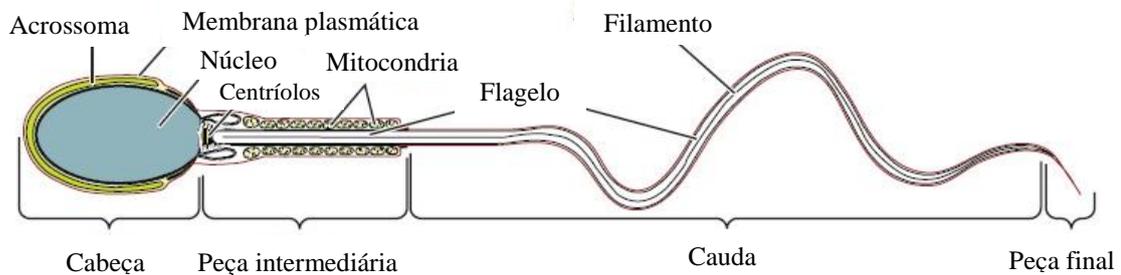
2.2.1. Análise convencional

Os testes laboratoriais de uso rotineiro há várias décadas, tais como a motilidade progressiva, vigor, vitalidade e integridade do acrossoma (SAACKE, 1983; BARTH & OKO,

1989; CRESPILO et al., 2009; COSTA et al., 2010) e avaliação da morfologia espermática (BLOM, 1972) podem ser utilizados para avaliar a qualidade do sêmen (MORADO et al., 2015). Porém, os parâmetros básicos analisados na rotina do exame laboratorial do sêmen congelado podem não refletir a real taxa de fertilidade do sêmen obtida no campo, principalmente devido à complexidade dos espermatozoides e o processo de fertilização (ARRUDA et al., 1992; COSTA et al., 2010).

Os espermatozoides são células complexas que apresentam uma cabeça com núcleo, colo e cauda (Figura 1). A cabeça é oval e achatada, além de conter o DNA e o acrossoma que é uma estrutura de dupla parede situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo, derivada do Complexo de Golgi. O acrossoma possui enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fertilização. O colo conecta a cabeça do espermatozoide à cauda. Na peça intermediária existe grande número de mitocôndrias que apresentam a função de produzir a energia necessária para a motilidade espermática e o axonema que está envolvido no mecanismo de motilidade espermática (EDDY, 1994). Já a membrana plasmática envolve todas as estruturas e mantém as diferenças entre o citosol e o ambiente extracelular (AMANN, 1993).

Figura 1. Representação da estrutura complexa do espermatozoide.



Fonte: modificado de <https://cnx.org/contents/Nw1tEY4R@3/>

A fertilidade masculina é complexa e depende de uma população heterogênea de espermatozoides que interage em vários níveis com o trato genital feminino. Por esta razão, avaliações laboratoriais do sêmen devem incluir testes para avaliação de diferentes atributos relevantes para a fertilização (RODRIGUEZ-MARTINÉZ, 2003). Deste modo, critérios mais sensíveis de avaliação da motilidade, morfologia, integridade e função espermática têm sido desenvolvidos e propostos como avaliações complementares na análise da qualidade seminal. Uma variedade de técnicas computadorizadas e sondas fluorescentes surgiram e possibilitaram uma análise laboratorial mais criteriosa da qualidade dos espermatozoides (ARRUDA et al.,

2011), incluindo a análise específica das estruturas que compõem os espermatozoides, por exemplo, o acrossoma, a membrana plasmática e a função mitocondrial. Embora essas medidas sejam úteis para avaliação *in vitro* de espermatozoides, apresentam limitada capacidade para prever a fertilidade a campo (AL NAIB et al., 2011).

2.2.2. Análise computadorizada

O sistema de análise computadorizada do movimento espermático (“*Computer Assisted Sperm Analysis*” - CASA) associado aos microscópios ópticos, têm sido aplicado na tentativa de aumentar a eficiência e a objetividade da avaliação convencional do sêmen (VERSTEGEN et al., 2002). O sistema CASA refere-se a um sistema que digitaliza imagens sucessivas dos espermatozoides e estabelece vários parâmetros da trajetória individual de cada espermatozoide, fornecendo informações rápidas e precisas (FARREL et al., 1998).

O sistema CASA analisa o movimento dos espermatozoides e classifica em quatro padrões pré-definidos: móvel não progressivo, linear lento, linear rápido e imóveis (MORTIMER & MAXWELL, 1999). O referido sistema também avalia variáveis da cinética espermática:

- a) Motilidade total: razão das células móveis no total de espermatozoides da amostra (%);
- b) Motilidade progressiva: razão das células móveis com movimento progressivo no total de espermatozoides da amostra (%);
- c) Velocidade curvilinear (VCL): indica a velocidade média mensurada de ponto a ponto de todo o trajeto percorrido pela célula ($\mu\text{m/s}$);
- d) Velocidade de trajeto (VAP): indica a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula ($\mu\text{m/s}$);
- e) Velocidade progressiva (VSL): indica a velocidade média percorrida em linha reta entre o início e o final do trajeto ($\mu\text{m/s}$);
- f) Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH): corresponde à largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento (μm);
- g) Frequência de batimento (BCF): definida como a frequência com que a cabeça do espermatozoide move-se durante o trajeto percorrido (Hz);
- h) Retilinearidade (STR): indica o afastamento da trajetória da célula espermática considerando-se uma linha reta (%);

i) Linearidade (LIN): indica o afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta (%);

j) Células rápidas (RAPID): indica a porcentagem de células rápidas na amostra (%);

h) Índice de oscilação (WOB) (ARRUDA, 2000; MORTIMER, 2000; VERSTEGEN, 2002).

Os parâmetros VSL, VAP e VCL mensuram o movimento espermático quantitativamente, enquanto LIN, STR, WOB, ALH e BCF definem o movimento qualitativamente (MORTIMER, 2000).

Figura 2. Análise computadorizada do movimento espermático bovino visualizado em microscópio óptico acoplado ao sistema computadorizado Sperm Class Analyser. Em vermelho visualiza-se a trajetória dos espermatozoides móveis.



Fonte: arquivo pessoal.

2.2.3. Sondas fluorescentes

O potencial fertilizante do espermatozoide depende da integridade e funcionalidade de diferentes estruturas celulares (OURA & TOSHIMORI, 1990). A avaliação de diferentes aspectos relacionados à morfologia espermática garante melhor estimativa da qualidade seminal (CELEGHINI et al., 2007; ARRUDA et al., 2011). Dessa forma, a identificação da funcionalidade ou integridade das estruturas espermáticas, com o uso de sondas fluorescentes, permite o diagnóstico preciso das características físicas dos espermatozoides por possuírem

capacidade de se ligar e marcar estruturas específicas das células (ARRUDA et al., 2011). A fluorescência é um indicador sensível e específico do estado de certas moléculas (oxidadas x reduzidas, ionizadas x não ionizadas, livres x ligadas), tendo aplicabilidade para mensurar mudanças metabólicas do interior das células (HAUGLAND, 2001). Adicionalmente, a avaliação simultânea da integridade de membrana plasmática e acrossomal e da função mitocondrial em espermatozoides bovinos é uma técnica eficiente (CELEGHINI et al., 2007).

2.2.3.1. Avaliação da membrana plasmática

As membranas exercem papel fundamental na manutenção da capacidade de fertilização espermática (OURA & TOSHIMORI, 1990; FLESH & GADELLA, 2000). A membrana plasmática é responsável pelo mecanismo de manutenção do equilíbrio osmótico celular, atuando como barreira entre os meios intra- e extracelulares. Danos nessa estrutura podem levar à perda da homeostase e, conseqüentemente, à morte celular (FLESH & GADELLA, 2000). A integridade da membrana plasmática é crucial para a sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo feminino e, também, para manter a capacidade de fertilização (OURA & TOSHIMORI, 1990). O iodeto de propídio (PI) é uma das sondas fluorescentes utilizadas para verificar a integridade da membrana plasmática ligando-se ao DNA das células que possuem membrana plasmática lesada (GARNER et al., 1986; GRAHAM et al., 1990) corando o espermatozoide em vermelho.

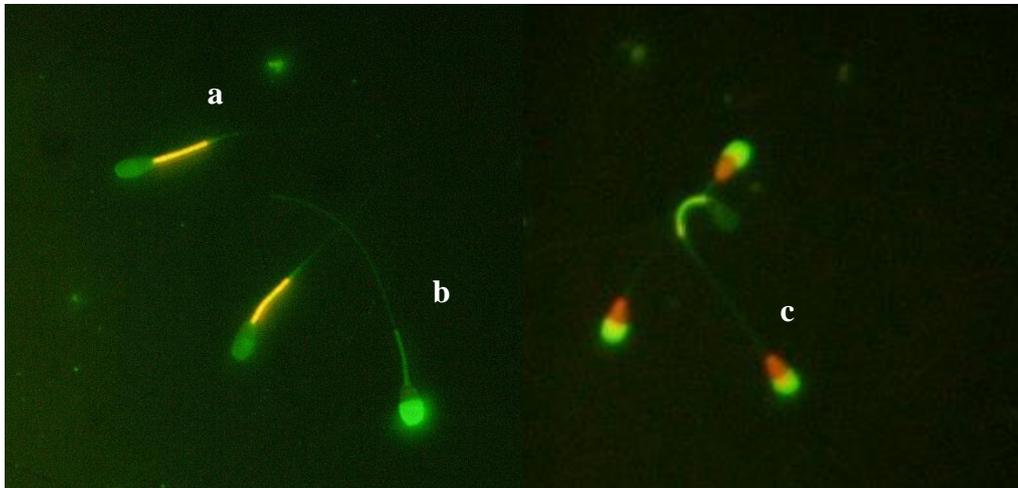
2.2.3.2. Avaliação da membrana acrossomal

A liberação de enzimas do acrossoma é essencial para a penetração do espermatozoide na zona pelúcida do oócito. A integridade do acrossoma dos espermatozoides após descongelamento da amostra de sêmen é fundamental ao potencial fertilizante dos espermatozoides (SAACKE, 1972; OURA & TOSHIMORI, 1990). As lectinas já serviram para avaliar o acrossoma, pois apresentam afinidade às moléculas de sacarídeos presentes no interior da matriz acrossomal e membrana acrossomal externa. A lectina mais utilizada é a aglutinina *Pisum sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) (CROSS & WATSON, 1994). Esta aglutinina, quando ligada ao FITC, tem a capacidade de marcar o acrossoma lesado na cor verde-amarelada (GRAHAM et al., 1990; CASEY et al., 1993).

2.2.3.3. Avaliação da funcionalidade mitocondrial

A principal função das mitocôndrias nas células é realizar a fosforilação oxidativa e produzir ATP, sendo uma fonte de energia metabólica indispensável à motilidade dos espermatozoides (OURA & TOSHIMORI, 1990). As rodaminas e as carbocianinas são os compostos habituais para a avaliação do potencial mitocondrial (REERS et al., 1991). Um tipo especial de multímero de carbocianinas, identificado como 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina iodeto (JC-1) tem sido usado como um ensaio sensível para detectar com precisão as alterações no potencial da membrana mitocondrial espermática em várias espécies de animais e, também, no homem (GARNER et al., 1997; DONELLY et al., 2000; CELEGHINI et al., 2007).

Figura 3. Espermatozoides bovinos corados com associação das sondas PI, FITC-PSA e JC-1 sob microscopia de fluorescência. a) Espermatozoide íntegro (membrana plasmática e membrana acrossomal íntegras com alto potencial mitocondrial); b) Espermatozoide com membrana plasmática íntegra, lesão acrossomal com baixo potencial mitocondrial; c) Espermatozoide com membranas plasmática e acrossomal lesadas com baixo potencial mitocondrial.



Fonte: arquivo pessoal.

2.2.4. Seleção espermática

Na fertilização *in vitro* (FIV), a seleção espermática é necessária para a obtenção de espermatozoides de alta capacidade fecundante a partir do sêmen descongelado, pois grande parte das células são danificadas durante os procedimentos de congelamento e

descongelamento do sêmen. Portanto, as técnicas de separação de espermatozoides são essenciais para remover o plasma, agentes crioprotetores e as células espermáticas danificadas (ZAVOS,1992; VERSTEGEN et al., 2002). Estas técnicas incluem o Sephadex, Lã de vidro, *Swim-up* e Percoll® (HAE-LEE LEE et al., 2009).

Em bovinos, as técnicas de Percoll® e *Swim-up* são as mais conhecidas e a aplicabilidade de ambas, bem como vantagens e desvantagens estão bem referidas na literatura (PARRISH et al., 1995; ARIAS et al., 2017). Para a produção *in vitro* de embriões bovinos a técnica de gradiente de Percoll® destaca-se como a mais utilizada. Pois, possibilita a seleção de espermatozoides com elevada motilidade e com qualidade morfológica superior (PARRISH et al., 1995). O meio comercial é um preparado em diferentes densidades/gradientes que permite selecionar os espermatozoides na centrifugação, apresentando uma taxa de recuperação espermática de 50% (PARRISH et al., 1995).

Em bovinos, a separação por gradientes de densidade tem aumentado a qualidade espermática, principalmente nos casos de alta viscosidade do sêmen, baixa qualidade ou sêmen criopreservado (HENKEL, 2012). No entanto, estas técnicas não são rotineiramente utilizadas nos exames laboratoriais do sêmen bovino.

2.2.5. Teste de termorresistência (TTR)

Um dos métodos de avaliação *in vitro* do sêmen após o descongelamento é o teste de termorresistência (TTR). O teste consiste na incubação de uma amostra de sêmen descongelado em banho-maria, em temperaturas e tempos pré-determinados (DIMITROPOULOS, 1967; ARRUDA et al., 1992). As condições simulam a temperatura de exposição dos espermatozoides no trato reprodutivo de fêmeas em cio sendo avaliada a motilidade espermática da amostra sob microscopia óptica (DIMITROPOULOS, 1967). O TTR é considerado teste complementar para verificar a qualidade espermática pós-descongelamento, segundo as normas de comercialização publicada pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (CBRA, 1998).

No entanto, alguns estudos demonstraram que os testes de termorresistência muito extremos não devem ser utilizados isoladamente para prever a fertilidade do sêmen congelado de bovinos, pois a temperatura pode causar aumento do metabolismo espermático, que leva ao uso mais rápido dos constituintes do diluente, resultando em um déficit energético (ARRUDA et al., 1992; VIANNA et al., 2009).

2.3. TESTES LABORATORIAIS E FERTILIDADE *IN VIVO*

O método mais representativo de estimar a fertilidade de um touro é por meio de testes a campo (ZHANG et al., 1999), porém este método tem baixa aplicabilidade e praticidade. Deste modo, avaliações de correlação entre a qualidade seminal *in vitro* e a fertilidade *in vivo* do reprodutor têm sido o tema de muitos estudos (SAACKE & WHITE, 1972; AMANN, 1989; ZHANG et al., 1999; RODRIGUEZ MARTINEZ, 2003; SUDANO et al., 2011). Contudo, quando as características espermáticas são comparadas isoladamente com a fertilidade testada nos rebanhos observam-se divergências entre os experimentos e geralmente baixas correlações são determinadas (ZHANG et al., 1999; SUDANO et al., 2011). Assim sendo, nenhum teste laboratorial isoladamente foi capaz de prever fidedignamente a fertilidade de um reprodutor (SUDANO et al., 2011). Portanto, julga-se razoável considerar que a predição do potencial de fertilidade de um touro é mais concisa quando se realiza a combinação de diversas análises espermáticas (ARRUDA et al., 2011).

Muitas pesquisas foram desenvolvidas para elaborar um teste laboratorial que pudesse prever o desempenho reprodutivo *in vivo* de touros levando em consideração o tempo, custo e praticidade. Este tipo de teste seria benéfico para a indústria de sêmen (AL NAIB et al., 2011; DHINESH KUMAR et al., 2015), pois reduziria a probabilidade de utilizar touros de baixa fertilidade nos programas reprodutivos (TARTAGLIONE & RITTA, 2004) e excluiria a necessidade de inseminar grande número de fêmeas para a realização dos testes de fertilidade *in vivo* (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2011; SUDANO et al., 2011; DHINESH KUMAR et al., 2015).

Para desenvolver tal teste é necessário primeiro descobrir a razão do sêmen descongelado de alguns touros resultar em taxa de prenhez mais elevada do que a de outros touros. Assim sendo, existem várias hipóteses sobre possíveis razões para tais diferenças, por exemplo, o sêmen congelado-descongelado de touros de baixa fertilidade pode apresentar uma alteração na morfologia ou atividade metabólica, ser incapaz de transpor o trato reprodutivo feminino até o local de fertilização em número suficiente, ou sua capacidade de fertilizar o oócito ou produzir um embrião pode estar prejudicada (AL NAIB et al., 2011).

2.4. PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Considerando a complexidade dos eventos envolvidos no processo de fertilização, é improvável que uma única característica espermática possa refletir a real capacidade fertilizante

da amostra seminal. O tempo ideal no qual a inseminação deve ocorrer em relação à ovulação depende principalmente da vida fértil dos espermatozoides e da viabilidade do oócito no trato genital feminino. Apesar do uso extensivo da IA em vacas, dados limitados estão disponíveis sobre o intervalo de tempo ideal entre a inseminação e ovulação (ROELOFS et al., 2006). Por ser um processo complexo, o momento da fertilização e o tempo ideal para a inseminação das vacas foram objeto de estudo de diversas pesquisas.

Lambert & McKenzie (1940) demonstraram que a ovulação ocorre entre 20 e 40 h depois do início do estro, isto é, 12 a 14 h após o encerramento da manifestação do estro. Trimberger (1948) demonstrou que as taxas de concepção foram mais elevadas quando as vacas leiteiras foram inseminadas entre 24 e 6 h antes da ovulação. Isso levou ao estabelecimento da recomendação "a.m.-p.m." que estabeleceu que as vacas em estro durante a manhã deveriam ser inseminadas no período da tarde e as que demonstravam estro durante a tarde deveriam ser inseminadas na manhã do dia seguinte. Esta metodologia é ainda utilizada atualmente.

Entretanto, Foote (1979) utilizou um grande número de vacas e demonstrou que as taxas máximas de concepção podem não ser alcançadas com uso da regra "a.m.-p.m.". Os mecanismos responsáveis pela diminuída fertilização de oócitos envelhecidos e os mecanismos que afetam o desenvolvimento embrionário constituem uma área interessante de pesquisa (ROELOFS et al., 2006).

Os protocolos de IATF são utilizados para controlar o crescimento folicular e a sincronização da ovulação, além de eliminar a necessidade de detecção do cio (BARUSELLI et al., 2004). Um aspecto comum entre protocolos de IATF é a inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona e a aplicação de benzoato de estradiol no primeiro dia do protocolo (D 0). No dia 8, o implante é retirado e aplica-se prostaglandina, cipionato de estradiol e gonadotrofina coriônica equina (eCG). A IA é realizada entre 48 e 60 h após retirada do dispositivo de progesterona (SÁ FILHO et al., 2010).

Atualmente, a administração de cipionato de estradiol na remoção de dispositivo de progesterona é amplamente aplicada, pois reduz a manipulação de animais, opostamente ao uso do benzoato de estradiol 24 h mais tarde que resultaria em um dia a mais de manejo com os animais (MENEGETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009). Adicionalmente, em vacas zebuínas submetidas à IATF, a ovulação induzida com cipionato de estradiol ocorreu em média 72 a 74 h após a remoção do dispositivo de progesterona (CREPALDI et al., 2008). A relação entre a utilização de cipionato de estradiol para indução da ovulação e diferentes momentos para a IA em vacas taurinas de corte lactantes ainda é pouco mencionada na literatura.

Embora já se tenha satisfatória taxa de fertilização com os programas de IATF, mais estudos são necessários para aprimorar os resultados e proporcionar maior conhecimento dos fatores que afetam as taxas de prenhez em vacas submetidas aos protocolos de IATF (SÁ FILHO et al., 2009). Pesquisas que visam a melhoria dos resultados relacionados à qualidade do sêmen nos programas de IATF são necessárias para identificar a influência que os parâmetros seminais avaliados pré e pós descongelamento exercem sobre as taxas de concepção dos rebanhos.

3 CAPITULO 1

Trabalho submetido para publicação no Periódico “Animal Reproduction Science”

Pregnancy rate according to bull, body condition score and estrus occurrence of suckled

***Bos taurus* beef cows submitted to timed artificial insemination**

Ana Paula Martini, Gilson Antonio Pessoa, Mara Iolanda Batistella Rubin

Abstract

This study evaluated the conception rate of suckled *Bos taurus* beef cows submitted to timed artificial insemination (TAI) with different batches of commercial semen. The study also shows the association of conception rate with estrus occurrence and body condition score (BCS) of cows. Data from 10,602 TAI were obtained from 2015 to 2017 on five farms in South Brazil. The TAI protocol consisted of the application of 2mg of estradiol benzoate IM on the first day, along with insertion of an intravaginal P4 device. Eight days later, P4 device was removed, and 12.5 mg of dinoprost tromethamine, 1 mg of estradiol cypionate plus 300 IU of equine chorionic gonadotropin was applied IM, followed by TAI 48h later. Only bulls (n = 36) with at least two batches, and with at least 50 AI in two different breeding groups, were included in the study. Conception rate per bull ranged from 42.6% (83/195; Bull L) to 74.3% (249/335; Bull K; $P < 0.001$). Conception rate in cows with $BCS \geq 3$ and estrus occurrence varied from 47.42% (46/97; Bull L) to 86.11% (93/108; Bull A) among bulls ($P = 0.001$). Conception rate differed between batches of one bull (B1 = 58.54%, B2 = 62.5% and B3 = 83.24%, $P < 0.0001$). In conclusion, there may be individual variation in the fertility of bulls on TAI and there is a conception rate difference between batches of the same bull. In addition, results confirmed that cows in estrus and $BCS \geq 3$ had an increased conception rate.

Keywords: Conception; Fertility; Bovine; Semen batches

1. Introduction

Artificial insemination (AI) is one of the main biotechnologies used to increase cattle herd productivity and profitability. Ovulation synchronization programs for timed AI (TAI) intensify the use of this biotechnology as well as improve the reproductive efficiency of beef herds (Baruselli et al., 2018, Meneghetti et al., 2009, Pessoa et al., 2018; Sá Filho et al., 2009; Sá Filho et al., 2013). In addition, the TAI protocols satisfactorily synchronize follicular

growth, corpus luteum (CL) regression and ovulation, which results in better reproductive performance, since all animals are inseminated independently of the estrus demonstration at the time of AI (Colazo & Mapletoft, 2014).

Several factors may influence the success of ovulation synchronization programs for TAI in beef cattle. Factors related to the cows such as breed, estrus occurrence, body condition and animal category have been the subject of various research studies (Baruselli et al., 2012; Meneghetti et al., 2009; Perry et al., 2007; Pessoa, et al., 2016; Sá Filho et al., 2009). However, bovine fertility is a multifactorial process that is not only related to the female. Adequate herd management, timing to use the AI, and semen quality are also directly related to fertility (Sá Filho et al., 2009; Sellem et al., 2015).

The measurement of parameters related to seminal quality and male fertility assumes a relevant influence on the productive efficiency on the herds (Morani et al., 2018; Schenatto et al., 2016). Additionally, semen quality may vary throughout the reproductive life of the bull, and even fertile bulls may produce ejaculates with poor fertilizing capacity, which can be related to age, genetic (Brito et al., 2002), environmental (Snoj et al., 2013) or nutritional (Singh et al., 2018) factors.

In dairy cows, a significant percentage of reproductive failures were attributed to infertile and subfertile bulls (Dejarnette et al., 2004), resulting in financial losses. In *Bos indicus* beef cows, variations in conception rates (7.2 % to 77.3%) were observed, according to the sires used in the TAI programs (Sá Filho et al., 2009). In contrast, does not exist research in *Bos taurus* beef cows shows the importance of seminal quality and variation of conception rates using different bulls in TAI programs.

Considering this scenario, the objective of this study was to evaluate the conception rate of suckled *Bos taurus* beef cows in TAI with different commercial bull semen in herds of

South Brazil. In addition, we investigated the association of the conception rate with the data regarding the estrus occurrence and BCS of cows.

2. Material and methods

2.1. Data source

The data of this study were obtained during a three-year period (2015 to 2017) on five commercial farms of Rio Grande do Sul - Brazil using TAI in multiparous *Bos taurus taurus* cows during the reproductive season (August to December).

During the study period, 15,632 inseminations were performed. For analysis and with the aim of eliminating the inseminator effect, 11,734 inseminations were considered to have been conducted by a single TAI-experienced veterinarian. In the general data analysis, 1,132 incomplete data (without BCS, estrus occurrence, bull, batches) were excluded, totaling 10,602 complete insemination data. Thus, the obtained data from 153 batches from 36 bulls conformed to the criterion of uniform distribution among TAI breeding group. The analysis of the results of comparison of bulls and batches included only bulls with data from at least 2 different batches and at least 50 inseminations of each bull in 2 different breeding groups, totaling 7,737 inseminations. Therefore, the research data was composed from results obtained from 71 batches obtained from 13 bulls (Fig. 1).

All batches of each bull were previously analyzed and only batches with minimum requirements of the Brazilian College of Animal Reproduction (2013), namely 30% sperm motility, vigor 3 and 70% of normal spermatozoa post-thawing were utilized.

2.2. Reproductive management

Suckled *Bos taurus taurus* cows, between 40 to 70 days postpartum and body condition score (BCS) of 2.82 ± 0.02 , based on a 1- to 5-point scale (1 = emaciated, 5 = obese), were submitted to estrus and ovulation synchronization protocol for the first insemination of the season. On Day 0, the synchronization protocol consisted of insertion of a P4 device (CIDR®, 1.9 g of P4, Zoetis, Campinas, SP, Brazil) and 2 mg of estradiol benzoate IM (Gonadiol®, Zoetis, Campinas, SP, Brazil). On Day 8, the P4 device was removed, and 12.5 mg of dinoprost tromethamine IM (Lutalyse®, Zoetis, Campinas, SP, Brazil) plus 1 mg of estradiol cypionate IM (E.C.P.®, Zoetis, Campinas, SP, Brazil) and 300 IU of Equine Chorionic Gonadotropin IM (eCG, Novormon®, Zoetis) were administered to all animals. On Day 10, cows underwent TAI 48 h after CIDR removal (Fig. 2). The semen doses of 36 bulls were obtained from a single semen processing center according to mating criteria and distributed in the breeding group of farms.

Tail-heads of the cows were marked with chalk (Raidl-Maxi, RAIDEX GmbH, Dettingen/Erms, Germany) at the removal of the P4 insert (Day 8). Estrus occurrence was evaluated at the moment of TAI and was determined based on the removal of the tail-head mark. Estrus was deemed to have occurred in cattle without a tail-head chalk mark at TAI. All cows had the BCS measurement recorded at the beginning of the TAI protocol. Cows were maintained in a native pasture, with free access to water and mineralized salt.

All procedures involved in this trial was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil (protocol 8876160217).

2.3. Ultrasound examination

At the insertion (Day 0) of the P4 insert, transrectal ultrasound examinations (Mindray DP 220 with 5MHz linear-array transducer, Shenzhen, China) were performed in all cows to evaluate uterine and ovarian health. All healthy females were submitted to the TAI protocol. Pregnancy diagnosis was performed by transrectal ultrasound 30 d after TAI. Pregnancy was characterized by visualization of an embryo with heartbeat and pregnancy rate was defined as the number of pregnant cows divided by the number of cows submitted to TAI in each treatment.

2.4. Statistical analysis

The data were submitted to a normality test (Shapiro-Wilk normality test). Frequency, means, and standard deviation were obtained through Proc Freq, Proc Means and Proc Univariate of the statistical package SAS 9.3®. Conception rate and occurrence of estrus were analyzed as response with binary distribution (0 = absence and 1 = presence) with the use of PROC GLIMMIX. The factors included in the model as fixed effects were as follows: bull, batches and females BCS. BCS was included in the model in two classes ($BCS \geq 3$ and $BCS < 3$). The herd was included in the model as a random effect. The LSMeans was applied to obtain adjusted means of the variables. Differences with $P < 0.05$ were considered significant.

The interactions between BCS, estrus occurrence, bull and batches were considered. Therefore, an initial descriptive analysis of design rates per bull in all 10,602 cows will be presented and later only in cows with $BCS \geq 3$ and with estrus manifestation ($n = 7,737$).

Only the bull presenting the highest number of inseminations in the same herd was considered to verify the effect of the batches, excluding cows with $BCS < 3$.

3. Results

3.1. General Results

Among the 10,602 inseminations, the mean of inseminations was 69.3 ± 5.6 per batches. The average conception rate per batch was 52.24%, ranging from 15.4% to 92.4% ($P < 0.001$). The mean of conception rate per bull was 52.1% and ranged from 33.3% to 85.1% ($P < 0.0001$).

The occurrence of estrus rate verified by the removal of the tail-head mark at the moment of TAI was 65.3% (6925/10602). The conception rate of 66.8% in females presenting estrus (4626/6925) was higher than the 26.3% observed in animals that did not present estrus (967/3677) at the time of AI ($P < 0.0001$).

3.2. Results obtained from 7,737 inseminations

3.2.1. Estrus and conception rate

Among the 7,737 inseminations, 34% (2668/7737) of the cows did not show estrus at the time of AI, and 65.5% (5069/7737) presented estrus. In addition, the conception rate differed between cows that showed estrus (63.04%, 3196/5069) and those not showing estrus (42.1%, 1123/2668; $P < 0.0004$) at AI.

The mean of conception rate was 55.8% (4320/7737). The conception per bull ranged from 42.6% (83/195; Bull L) to 74.3% (249/335; Bull K; $P < 0.001$) (Table 1).

Considering only cows presenting estrus at the time of AI, Table 2 shows that bulls with lowest and highest conception rate presented difference ($P < 0.001$), with 46.15% (30/65; Bull D) and 83.07% (324/390, Bull A), respectively.

Table 2 shows the results of cows that did not show estrus at AI. The conception rate was lower in cows that did not present estrus compared to those that presented estrus at the time of AI ($P < 0.0001$). Bulls with lower (29.0%, 41/141; Bull G) and highest (61.3%, 65/106; Bull K) conception rate also differed significantly ($P < 0.001$).

3.2.2. Body condition score, estrus and conception rate

Among the 7,737 inseminations evaluated, cows with $BCS \geq 3$ (70.6%; 1455/2062) had superior conception rate to cows with $BCS < 3$ (51.7%; 2603/5034; $P = 0.001$).

When analyzing the conception rate of animals with $BCS \geq 3$ and that demonstrated estrus at the TAI, a significant individual variation in the conception rate among the bulls ($P = 0.001$) was observed, from 47.42% (46/97; Bull L) to 86.11% (93/108; Bull A) (Table 3).

3.2.3. Bull and conception rate

Bulls A, B and K had higher conception rate than other bulls, both in the evaluation of the general data (A= 60.5%; B= 65.0% and K= 74.3%), as in cows with estrus (A= 83.1%; B= 77.6% and K= 80.3%), as well as in the females that presented $BCS \geq 3$ (A= 86.1%; B= 81.6% and K= 83.9%). Bulls I and L already showed conception rates lower than other bulls, both in the evaluation of general data (I= 46.9% and L= 42.6%), and in cows with demonstration of estrus (I= 51.3% and L= 46.3%) and in cows with $BCS \geq 3$ (I= 51.8% e L= 47.4%).

3.2.4. Semen batches and conception rate

The bull that presented the highest number of batches used in cows with BCS ≥ 3 in the same herd resulted in different conception rates between batches evaluated ($P < 0.0001$, Table 4).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study with *Bos taurus taurus* cows that presents data related to the variation of bull fertility on the TAI. This study is an analysis of a large dataset collected during a 3-year period, involving a total of 10,602 TAI of suckled beef cows.

The research showed that there was an individual affect of the bull on the conception rate of Suckled *Bos taurus* cows submitted to the TAI protocol. The same bull that had a higher conception rate in the general context of the study was also superior in cows that presented estrus at the time of AI and in those that presented BCS ≥ 3 . Although all semen batches were previously analyzed and released for use in AI with the minimum parameters defined by the Brazilian College of Animal Reproduction (2013), there was still a below-average conception rate (50%) in four evaluated breeding animals. Our research corroborates the study developed by Sá Filho et al. (2009) with Nelore cows (*Bos indicus*), which showed a consistently affected pregnancy rate ($P < 0.01$) by the bull used in AI, whose results ranged from 7.2% to 77.3%. Thus, the success of AI programs is dependent on the quality of the semen used, and better conception rate can be obtained when bulls with good fertility histories are used during the breeding season (Sudano et al., 2011).

TAI programs allow cow insemination regardless of cyclicity and eliminate the need for estrus detection. These programs also provide a systematic approach to the use of TAI, facilitating its use in cattle herds (Pessoa et al., 2016). However, the identification of estrus at the time of insemination is a parameter of fundamental importance and should be evaluated during TAI programs. This observation is based on the results of this study, where it was shown that, independently of the bull used, the cows that demonstrated estrus at the moment of TAI resulted in higher pregnancy rates. In addition, females with $BCS \geq 3$ had a higher conception rate than those with $BCS < 3$ at the beginning of the TAI protocol. Similar results have previously been reported by Pessoa et al. (2018) in suckled beef cows with $BCS > 2.75$ (47.07%, 153/325) that presented a higher pregnancy rate at the beginning of the breeding season than cows with $BCS < 2.75$ (20.8%, 132/635, $P < 0.0001$).

In this study, it was possible to identify differences in the conception rate of different batches of the same breeder, although the three batches presented a minimum of 50% of motility and vigor 3. The lack of explanations for the difference in fertility potential of a semen batch may be related to the sperm parameters not evaluated in the conventional analysis, or could still be related to age (Brito et al., 2002), environmental factors (Snoj et al., 2013), or nutritional factors (Singh et al., 2018). Additionally in our study, B2 batch was processed in November 2015 and B1 and B3 in June 2016, showing that although the batches were used in the same herd and in the same breeding season in females with $BCS \geq 3$, there was still a change in the conception rate of 24.7% between batches B1 and B3. The wide range of intrinsic and extrinsic factors related to the bull can justify the differences in the fertility of bull semen, which results in different conception rates of females submitted to TAI.

5. Conclusion

The data obtained in this study with suckled *Bos taurus* beef cows demonstrate that there is individual variation in the fertility of bulls used in TAI programs. There was a difference in conception rate with the use of different batches of semen from the same bull. In addition, this study confirmed that higher conception rates are obtained in females with BCS ≥ 3 presenting estrus at the time of AI.

Acknowledgements

The authors also thank the Agropecuária Posto Branco (Júlio de Castilhos/RS), Fazenda Nova Querência (São Martinho da Serra/RS), Fazenda Baviera (Quaraí/RS), Fazenda Bela Vista (Uruguaiana/RS) and, Fazenda Pelegrini (Dom Pedrito/RS) for allowing the use of their data. The first author, as a fellow of the post-graduate program in veterinary medicine at UFSM, received a Brazilian government grant from CAPES.

Conflict of interest

None.

References

- Baruselli, P.S., Sales, J.N.S., Sala, R.V., Vieira, L.M., Sá Filho, M.F. 2012. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. *Anim. Reprod.* 9, 139-152.
- Baruselli, P.S., Ferreira, R.M., Sá Filho, M.F., Bó, G.A. 2018. Review: Using artificial insemination vs. natural service in beef herds. *Anim. Reprod.* 12, 45-52.

- CBRA. 2013. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 3ª ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte.
- Colazo, M.G.; Mapletoft, R.J. 2014. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *Can. Vet. J.* 55, 772-780.
- Dejarnette, J.M., Marshall, C.E., Lenz, R.W., Monke, D.R., Ayars, W.H., Sattler, C.G. 2004. Sustaining the fertility of artificially inseminated dairy cattle: the role of the artificial insemination industry. *J. Dairy Sci.* 87, 93-104.
- Meneghetti, M., Sá Filho, O.G., Peres, R.F.G., Lamb, G.C., Vasconcelos, J.L.M. 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. *Theriogenology.* 72, 179–189.
- Morani, E.S.C.; Rodrigues, L.H.; Roncoletta, M. 2018. Manual de reprodução nas espécies domésticas – avaliação e empregabilidade do sêmen, 1st ed. Medvet, São Paulo.
- Perry, G.A., Smith, M.F., Roberts, A.J., MacNeil, M.D., Geary, T.W. 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 85, 684-689.
- Pessoa, G.A., Martini, A.P., Carloto, G.W., Rodrigues, M.C.C., Claro J.I., Baruselli, P.S., Brauner, C.C., Rubin, M.I.B., Corrêa, M.N., Leivas, F.G., Sá Filho, M.F. 2015. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial inseminations protocol. *Theriogenology.* 85, 792-799.
- Pessoa, G.A., Martini, A.P., Sá Filho, M.F., Rubin, M.I.B. 2018. Resynchronization improves reproductive efficiency of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to spring-summer or autumn-winter breeding season in South Brazil. *Theriogenology.* 122, 14-22.

- 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.
- Sá Filho, M.F., Penteado, L., Reis, E.L., Reis, T.A.N.P.S., Galvão, K.N., Baruselli, P.S. 2013. Timed artificial insemination early in the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows. *Theriogenology*. 79, 625-632.
- Schenatto, R.O., Tretin, J.M., Casarin, J.B.S., Fiorenza, M.S., Araujo, L.B., Balestrin, T.S., Maciel, N., Martini, A.P., Pessoa, G.A., Rubin, M.I.B. 2016. Impacto no desempenho de touros nos programas de IATF. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Foz do Iguaçu, Anais... p. 234.
- Sellem, E., Broekhuijse, M.L.W. Chevrier, J. L., Camugli, S., Schmitt, E., Schibler, L., Koenen, E.P.C. 2015. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology*. 84, 1447-1454.
- Singh, A.K., Rajak, S.K., Kumar, P., Kerketta, S., Yogi, R.K. 2018. Nutrition and bull fertility: A review. *J. Entomol. Zool. Stud.* 6, 635-643.
- Snoj, T., Kobal, S., Majdic, G. 2013. Effects of season, age, and breed on semen characteristics in different *Bos taurus* breeds in a 31-year retrospective study. *Theriogenology*. 79:847–852.
- Sudano, M.J., Crespilho, A.M., Fernandes, C.B., Martins Junior, A., Papa, F.O., Rodrigues, J., Machado, R., Landim-Alvarenga, F.C. 2011. Use of Bayesian inference to correlate *in vitro* embryo production and *in vivo* fertility in Zebu bulls. *Vet. Med. Int.* 1-6.

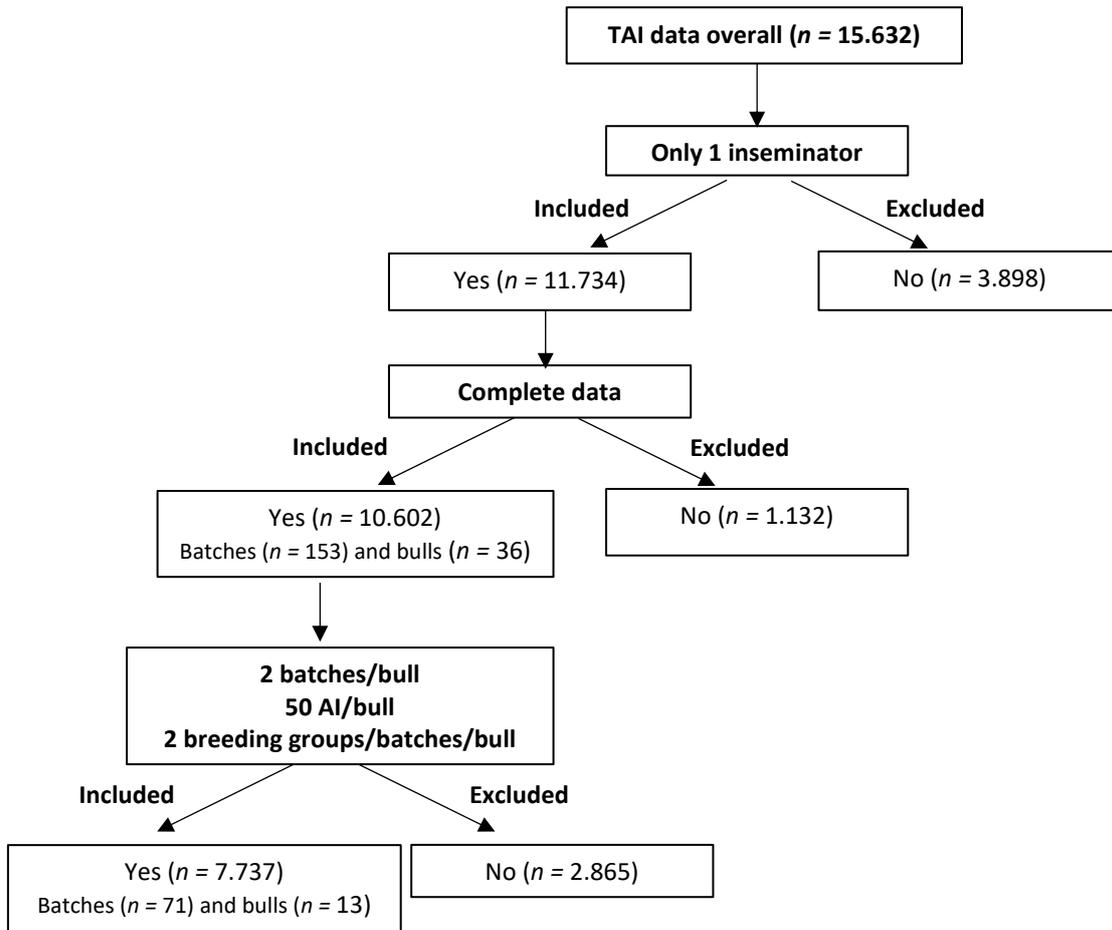


Fig. 1. Schematic diagram of inclusion or exclusion of study data.

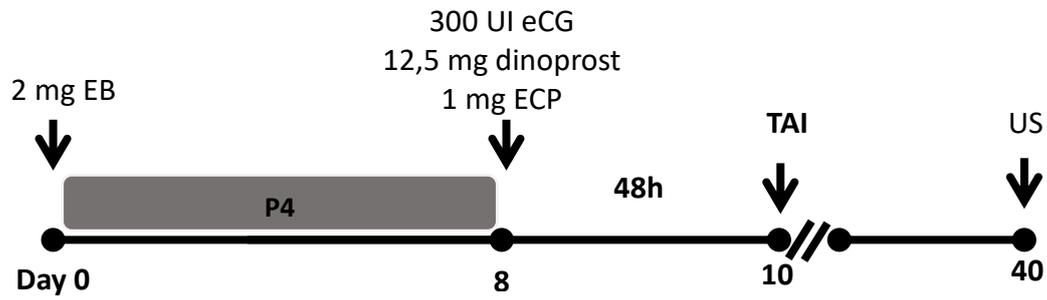


Fig. 2. Experimental design. EB = 2 mg of estradiol benzoate; eCG = 300 IU of equine chorionic gonadotropin; ECP = 1 mg of estradiol cypionate; dinoprost = 12.5 mg of dinoprost trometamina; TAI = timed artificial insemination performed 48 h after removal of the progesterone (P4) insert; US = ultrasound examination (pregnancy diagnosis).

Table 1. Mean of conception rate (\pm standard deviation) in suckled *Bos taurus* beef cows ($n = 7,737$) inseminated with semen from 13 different bulls.

Bull	N. of AI	P/AI % (n/n)*
A	821	60.53 \pm 1.66 ^{bc} (496/821)
B	1654	65.05 \pm 1.17 ^{ab} (1076/1654)
C	756	51.45 \pm 1.73 ^d (389/756)
D	110	48.18 \pm 4.55 ^{cd} (53/110)
E	303	56.10 \pm 2.74 ^{bcd} (170/303)
F	377	52.51 \pm 2.46 ^{cd} (198/377)
G	789	50.31 \pm 1.70 ^d (397/789)
H	224	51.78 \pm 3.19 ^{cd} (116/224)
I	420	46.90 \pm 2.33 ^d (197/420)
J	282	44.68 \pm 2.84 ^d (126/282)
K	335	74.32 \pm 2.61 ^a (249/335)
L	195	42.56 \pm 3.42 ^d (83/195)
M	1471	52.27 \pm 1.24 ^d (769/1471)
Overall	7737	55.83 \pm 0.56 (4319/7737)

^{a,b,c,d} Different lowercase letters in the column indicate difference ($P < 0.05$)

* Pregnancy per AI (P/AI) 30 days after TAI.

Table 2. Mean of conception rate (\pm standard deviation) in suckled *Bos taurus* beef cows that demonstrated estrus ($n = 5,069$) and without estrus on the TAI ($n = 2,668$) and inseminated with semen from 13 different bulls.

Bull	Estrus	Without estrus
	P/AI % (n/n)*	P/AI % (n/n)*
A	83.07 \pm 1.9 ^a (324/390)	40.0 \pm 4.9 ^b (172/430)
B	77.58 \pm 1.29 ^a (810/1044)	43.6 \pm 4.96 ^{bcde} (266/610)
C	62.09 \pm 2.26 ^b (285/459)	35.0 \pm 4.77 ^a (104/297)
D	46.15 \pm 6.23 ^b (30/65)	51.1 \pm 5.05 ^{bcde} (23/45)
E	57.56 \pm 3.00 ^b (156/271)	43.7 \pm 5.04 ^{bcde} (14/32)
F	56.66 \pm 3.02 ^b (153/270)	42.0 \pm 4.95 ^{bc} (45/106)
G	54.93 \pm 1.95 ^b (356/648)	29.0 \pm 4.55 ^e (41/141)
H	55.37 \pm 4.53 ^b (67/121)	47.6 \pm 5.0 ^{abcd} (49/103)
I	51.32 \pm 3.07 ^b (136/265)	39.3 \pm 4.9 ^{abcde} (61/155)
J	54.63 \pm 5.08 ^b (53/97)	39.4 \pm 4.9 ^{abc} (73/185)
K	80.34 \pm 2.63 ^a (184/229)	61.3 \pm 4.9 ^{de} (65/106)
L	46.29 \pm 4.8 ^b (50/108)	37.9 \pm 4.8 ^{bc} (33/87)
M	53.72 \pm 1.50 ^b (592/1102)	47.9 \pm 5.0 ^{cd} (177/369)
Overall	63.04 \pm 0.67 ^A (3196/5069)	42.1 \pm 4.93 ^B (1123/2668)

^{a,b,c,d,e} Different lowercase letters in the column indicate difference ($P < 0.05$)

^{A,B} Different uppercase letters in the column indicate difference ($P < 0.0001$)

* Pregnancy per AI (P/AI) 30 days after TAI.

Table 3. Mean of conception rate (\pm standard deviation) in suckled *Bos taurus* beef cows ($n = 2,062$) that demonstrated estrus and with body condition score ≥ 3 inseminated with semen from 10 different bulls.

Bull	N. of AI	P/AI % (n/n)*
A	108	86.11 \pm 3.34 ^a (93/108)
B	501	81.63 \pm 1.73 ^a (409/501)
C	290	69.65 \pm 2.70 ^b (202/290)
E	122	64.75 \pm 4.34 ^{bcd} (79/122)
F	122	63.93 \pm 4.36 ^{bcd} (78/122)
G	195	65.64 \pm 3.40 ^{bc} (128/195)
I	81	51.85 \pm 5.58 ^{cd} (42/81)
K	168	83.92 \pm 2.84 ^a (141/168)
L	97	47.42 \pm 5.09 ^d (46/97)
M	378	62.69 \pm 2.49 ^{bcd} (237/378)
Overall	2062	70.56 \pm 1.00 (1455/2062)

^{a,b,c,d} Different lowercase letters in the column indicate difference ($P < 0.05$)

* Pregnancy per AI (P/AI) 30 days after TAI.

Table 4. Mean of conception rate (\pm standard deviation) in suckled *Bos taurus* beef cows ($n = 620$) with body condition score ≥ 3 from the same farm, inseminated with 3 different batches (B1, B2 e B3) from a single bull (Bull B).

Batch	N. of AI	P/AI % (n/n)
B1	123	58.54 \pm 4.46 ^b (72/123)
B2	312	62.50 \pm 2.74 ^b (195/312)
B3	185	83.24 \pm 2.75 ^a (154/185)
Overall	620	67.90 \pm 1.87 (421/620)

^{a,b} Different lowercase letters in the column indicate difference ($P < 0.05$)

4 CAPITULO 2

Trabalho a ser submetido para publicação:

**Taxa de prenhez em diferentes momentos da IATF, cinética e funcionalidade
espermática em touros de alta e baixa fertilidade**

Ana Paula Martini, Gilson Antonio Pessoa, Eliana Burtet Parmeggiani, Daniele Missio, Hyria

Fernandes Pinto, Daniela dos Santos Brum, Manoel Francisco Sá Filho, Mara Iolanda

Batistella Rubin

Resumo

Este estudo teve como objetivos: 1) avaliar a influência do momento da IA 48 ou 54 h após a retirada do implante de progesterona sobre a taxa de concepção com uso de sêmen de touros *Bos taurus taurus* de alta e baixa fertilidade; 2) definir se há testes laboratoriais de cinética e funcionalidade espermática após TTR e seleção espermática associados com a fertilidade *in vivo* de touros de alta e baixa fertilidade. No experimento 1, vacas taurinas lactantes (n = 460) foram submetidas ao mesmo protocolo de IATF e inseminadas em tempo fixo 48 ou 54 h após a remoção do implante intravaginal de progesterona. Dezoito partidas de sêmen bovino congelado provenientes de seis touros Aberdeen Angus, sendo três de alta e três de baixa fertilidade foram utilizadas na IATF. As variáveis touro e partida foram igualmente distribuídas entre os lotes de fêmeas inseminadas. O diagnóstico de gestação foi efetuado 30 dias após IATF. No experimento 2 foram utilizados touros e partidas do experimento 1. As análises laboratoriais executadas foram a convencional com avaliação subjetiva de motilidade e vigor, além da avaliação objetiva computadorizada da cinética espermática e avaliação da funcionalidade espermática por microscopia de epifluorescência. As análises espermáticas foram conduzidas no momento do descongelamento do sêmen e após teste de termorresistência (TTR) de 3 h sem ou com seleção espermática por gradiente de Percoll® (P+TTR). No experimento 1, a taxa de concepção aos 30 dias diferiu entre os touros de alta (49,2%; 113/228) e baixa fertilidade (38,7%; 90/232; P=0.02). Considerando a fertilidade alta ou baixa e o momento da inseminação (48 h e 54 h), a concepção foi similar entre touros de alta fertilidade, nas 48 h (52,6%; 119/228) e 54 h (45,7%; 109/228), bem como com touros de baixa fertilidade nas 54 h (42,9; 119/232), diferentemente de touros de baixa fertilidade cujas fêmeas foram inseminadas às 48 h (34,5%; 113/232; P=0.0065). No experimento 2, houve similaridade nos parâmetros da avaliação subjetiva, cinética e funcionalidade espermática

entre touros de alta e baixa fertilidade após o descongelamento. A avaliação da cinética espermática revelou que os valores de Velocidade do Trajeto (VAP), Velocidade Curvilinear (VCL) e Velocidade Progressiva (VSL) foram inferiores no grupo baixa fertilidade ($P < 0.0003$, $P < 0.0004$ e $P = 0.005$, respectivamente) comparado ao grupo de touros de alta fertilidade. Verificou-se menor frequência de batimento (BCF) da cabeça do espermatozoide no grupo de touros de baixa fertilidade ($P = 0.01$) após o TTR, mas não após P+TTR. Concluindo, o atraso na inseminação artificial em vacas de corte *Bos taurus taurus* lactantes incrementou a taxa de concepção de programa de IATF com uso de touros considerados de baixa fertilidade. Adicionalmente, pode-se identificar que após o TTR os espermatozoides de touros de baixa fertilidade apresentam menor velocidade (VAP, VCL e VSL) do que os espermatozoides de touros de alta fertilidade. Portanto, o atraso na inseminação artificial com uso de sêmen de touros de baixa fertilidade pode proporcionar a inseminação mais próximo da ovulação e favorecer os espermatozoides com cinética de movimento comprometida.

Palavras-chave: vacas taurinas, reprodução, concepção.

1. Introdução

A inseminação artificial (IA) está entre as principais ferramentas para aumentar a produtividade e rentabilidade dos rebanhos bovinos. Adicionalmente, programas de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) intensificam o uso desta biotecnologia, bem como a eficiência reprodutiva dos rebanhos [1-6]. Em 2017, no Brasil foram comercializadas 12.134.438 doses de sêmen bovino para IA [7]. Neste contexto, garantir a qualidade do sêmen bovino a ser vendido é uma preocupação para os centros de colheita e processamento de sêmen. Entretanto, os parâmetros básicos analisados na rotina do exame laboratorial do sêmen congelado podem não refletir a taxa de fertilidade obtida no

campo, principalmente devido à complexidade dos espermatozoides e do processo de fertilização [8, 9].

Critérios mais sensíveis de avaliação da motilidade, morfologia, integridade e função espermática têm sido desenvolvidos e propostos como avaliações complementares na análise da qualidade seminal. Com isso, várias técnicas computadorizadas e sondas fluorescentes foram desenvolvidas e possibilitaram uma análise laboratorial mais criteriosa da qualidade dos espermatozoides [10], incluindo a análise específica das estruturas que compõem os espermatozoides, por exemplo, o acrossoma, a membrana plasmática e potencial mitocondrial. Embora essas medidas sejam úteis para avaliação *in vitro* de espermatozoides, apresentam capacidade limitada para prever a fertilidade *in vivo* [11].

O Teste de termorresistência é um método complementar de avaliação *in vitro* do sêmen após o descongelamento. O teste consiste na incubação de uma amostra de sêmen descongelado em banho-maria, em temperaturas e tempos pré-determinados [8, 12] simulando a temperatura de exposição dos espermatozoides no trato reprodutivo de fêmeas em cio, com avaliação da motilidade espermática da amostra sob microscopia óptica [12].

A seleção de espermatozoides é necessária na fertilização *in vitro* de embriões para a obtenção de espermatozoides de boa qualidade a partir do sêmen congelado-descongelado, pois grande parte dos espermatozoides são danificados durante os procedimentos de criopreservação do sêmen. Assim sendo, as técnicas de separação de espermatozoides são essenciais para remover o plasma, agentes crioprotetores e as células espermáticas danificadas [13, 14]. Para a produção *in vitro* de embriões bovinos a técnica de gradiente de Percoll® destaca-se como a mais utilizada [15]. O procedimento pode ser utilizado para mimetizar o processo de seleção dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea, porém não é rotineiramente utilizado nos exames laboratoriais de avaliação do sêmen bovino.

O método mais representativo de estimar a fertilidade de um touro é por resultados de fertilidade testada nos rebanhos [16]. Deste modo, avaliações de correlação entre a qualidade seminal *in vitro* e a fertilidade *in vivo* do reprodutor têm sido objeto de muitos estudos [16-20]. Contudo, quando as características espermáticas são comparadas isoladamente com a fertilidade resultante no campo observa-se divergências entre os experimentos e geralmente verifica-se baixa correlação [16, 20].

Por conseguinte, a fertilidade bovina é um processo multifatorial relacionado à fêmea, manejo adequado do rebanho, momento preciso para utilizar a IA e qualidade do sêmen [21]. Além disso, a fertilização depende da capacidade do espermatozoide ativar os mecanismos fisiológicos de hiperativação, capacitação, reação acrossomal e fusão ao oócito.

Desta forma, este estudo teve como objetivos: 1) avaliar a influência do momento da IA (48 h ou 54 h) após a retirada do implante de progesterona sobre a taxa de concepção após IATF com touros de alta e baixa fertilidade, e 2) definir se há testes laboratoriais de cinética e funcionalidade espermática após TTR e seleção espermática que estejam associados com a fertilidade a campo de touros *Bos taurus taurus* previamente confirmados como de alta e baixa fertilidade.

2. Material e métodos

2.1. Experimento 1. In vivo

2.1.1. Animais e manejo

O experimento foi conduzido em duas fazendas comerciais de bovinos de corte localizadas no Rio Grande do Sul-Brasil, durante a estação reprodutiva 2016-2017. Um total de 460 vacas *Bos taurus taurus* de corte lactantes com escore de condição corporal (ECC) de 2.72 ± 0.3 (Escala de pontos de 1 a 5, sendo 1 = muito magra e 5 = obesa) foram utilizadas neste estudo. As vacas, mantidas em pastagem nativa com acesso livre a água e

suplementação mineral tiveram todos os procedimentos de manipulação de animais de acordo com as diretrizes gerais para o bem-estar animal (CEUA-UFSM protocolo nº 8876160217). Informações sobre as vacas como grupos de manejo, ECC no início do protocolo de IATF, ciclicidade, demonstração de estro no momento da IA e taxa de prenhez de cada grupo estão detalhadas na Tabela 1.

2.1.2. Manejo reprodutivo e desenho experimental

Vacas de corte lactantes, com 40 a 70 dias pós-parto foram aleatoriamente distribuídas em 2 grupos levando em consideração o momento da inseminação artificial: IA 48 h (n= 232) ou IA 54 h (n= 228) após a remoção do implante intravaginal de progesterona (CIDR®, Zoetis, Brasil). No dia 0 (D0), o protocolo de sincronização consistiu na inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, 1.9 g de P4, Zoetis, Campinas, SP, Brasil) e aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®, Zoetis, Campinas, SP, Brasil) por via intramuscular. No D8, a P4 foi removida e aplicados 12.5 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis, Campinas, SP, Brasil), 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Zoetis, Campinas, SP, Brasil) e 400 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG, Novormon®, Zoetis) por via intramuscular, em todas fêmeas. As vacas foram marcadas na base da cauda com bastão marcador colorido (Raidl-Maxi, RAIDEX GmbH, Dettingen/Erms, Alemanha) no momento da remoção da P4 (D8) para identificação do estro no dia da inseminação. No D10, as vacas foram inseminadas em tempo fixo, 48 h ou 54 h após a remoção do CIDR, com sêmen de 3 touros de alta e 3 touros de baixa fertilidade (Figura 1). A ocorrência do estro foi avaliada no momento da IA e determinada pela presença ou ausência da tinta na base da cauda das vacas. Estabeleceu-se como presença do estro nas vacas quando a tinta foi removida.

2.1.3. Sêmen dos touros

O experimento foi executado com 460 doses de sêmen congelado comercial proveniente de 6 touros da raça Aberdeen Angus com fertilidade previamente conhecida e disponibilizada por empresa de processamento de sêmen, sendo 25 doses de 3 partidas diferentes para cada touro. As doses de sêmen foram ordenadamente usadas para que todas as partidas fossem igualmente distribuídas em todos lotes de vacas submetidas à IATF. As palhetas de sêmen foram descongeladas em descongelador eletrônico (WTA, São Paulo, Brasil) a 37°C por 30 segundos e a técnica da IA foi realizada por um único inseminador.

2.1.4. Exame ultrassonográfico

No momento da inserção da P4 (D0) foi realizado exame ultrassonográfico transretal (Mindray DP 220 com transdutor linear de 5MHz, Shenzhen, China) em todas as vacas (n=460) para avaliação dos ovários e útero. O diagnóstico de gestação foi conduzido por ultrassonografia transretal 30 dias após a IA (D40). A gestação foi caracterizada pela visualização do embrião e presença de batimentos cardíacos. A taxa de prenhez foi definida pelo número de vacas gestantes dividido pelo número de vacas submetidas à IA.

2.2. *Experimento 2. In vitro*

2.2.1. Avaliação laboratorial do sêmen

Touros e partidas do experimento 1 foram objeto de análise laboratorial no Laboratório Biotech (Universidade Federal do Pampa - Unipampa, Uruguaiana/RS). Um total de 216 doses de sêmen de 6 touros Aberdeen Angus foram avaliadas em 3 repetições.

2.2.2. Procedimentos laboratoriais

A avaliação laboratorial do sêmen foi executada por análise individual de 3 partidas diferentes de cada touro. Para isto, 4 palhetas de 0,25 mL de cada partida foram utilizadas para cada repetição, totalizando 12 palhetas por partida para cada reprodutor. A avaliação imediata (0 h) foi efetuada após o descongelamento da amostra em descongelador eletrônico (WTA, São Paulo, Brasil) a 37°C por 30 segundos e acondicionamento em microtubo cônico de 1,5 mL. Na avaliação imediata foi realizada análise convencional do sêmen (motilidade total e vigor) por microscopia óptica (Nikon, Eclipse Ci, Melville, NY, USA). Já a avaliação objetiva foi executada em sistema computadorizado (SCA) obtendo-se dados da cinética espermática. A avaliação da funcionalidade espermática foi efetuada por microscopia de epifluorescência.

2.2.3. Teste de Termorresistência (TTR) fisiológico

Após a avaliação imediata, 0,25mL da amostra descongelada foi armazenada em palheta de 0,25mL para o Teste de Termorresistência fisiológico por 3 h a 36°C em banho-maria (TTR) [22]. A outra porção de 0,75mL foi submetida ao protocolo de seleção espermática por gradiente de Percoll® (P) para a seleção espermática, anteriormente ao TTR (P+TTR). Após o período de 3 h em banho-maria, as 2 amostras (TTR e P+TTR) foram submetidas às mesmas avaliações da seção 2.2.2.

2.2.4. Procedimento de seleção espermática

A solução isotônica de Percoll® (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) foi utilizada para preparar as soluções diluídas de 90%, 60% e 30% com meio TALP-fert modificado [23]. Para a formação do gradiente de densidade de Percoll®, 300 µL de cada diluição foram acondicionados de forma decrescente, do 90% ao 30% em um tubo cônico de 1,5 mL. No topo do gradiente de Percoll®, 150 µL de sêmen descongelado foi depositado e o tubo foi

centrifugado por 5 minutos à $2.200 \times g$ [24]. O sedimento resultante foi ressuspenso em 300 μL de TALP-sperm e centrifugado novamente por 1 minuto à $2.200 \times g$. Após a centrifugação, as amostras foram analisadas sob microscopia óptica e encaminhadas ao Teste de Termorresistência.

2.2.5. Avaliação da cinética das células espermáticas

A cinética dos espermatozoides foi analisada com um Sistema de análise computadorizado equipado com o software Sperm Class Analyzer (SCA; Version 5.1; Microptic, Barcelona, Spain). Uma amostra de 4 μL de sêmen entre lâmina e lamínula (25×10^6 espermatozoides/mL) foi preparada para leitura. As seguintes variáveis foram analisadas: porcentagem total de espermatozoides móveis (MT, %); porcentagem de espermatozoides progressivamente móveis (MP, %), velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), velocidade média do trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH; μm), frequência de batimento (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %; VSL/VAP), linearidade (LIN; %; VSL/VCL) e oscilação ($\text{WOB} = \text{VAP}/\text{VCL} \times 100 \%$).

2.2.6. Análise simultânea da membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial

As amostras foram submetidas à avaliação morfofuncional sob microscopia de epifluorescência pelo uso associado das sondas Iodeto de Propídio (PI), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com Isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e iodeto de 5,5',6,6' tetracloro 1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolil Carbocianina (JC-1), para integridade de membrana plasmática, viabilidade acrossomal e função mitocondrial, respectivamente [25]. Uma alíquota de 150 μL de sêmen em TALP-sperm, na concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL (200 μL de sêmen diluído em 1000 μL de TALP-sperm) foi adicionada à 3 μL de PI (0,5 mg/mL em DPBS; Sigma-Aldrich), 6 μL de JC-1 (153 μM em DMSO;

Sigma-Aldrich) e 50 μL de FITC-PSA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em DPBS; Sigma-Aldrich) em tubo de microcentrífuga de 2 mL. A amostra foi incubada por 8 minutos a 37°C imediatamente após preparo.

Após a incubação, 8 μL da amostra foram depositados entre lâmina e lamínula pré-aquecidas à 37°C . Para cada amostra, um total de 200 células espermáticas foram avaliadas imediatamente por microscopia de epifluorescência (IX-51; Olympus, Tokyo, Japan) em filtro triplo (D/F/R, C58420): UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm) com aumento de $400\times$ em ambiente escuro. Os espermatozoides foram classificados de acordo com o padrão de emissão de fluorescência de cada sonda em: PIAIA) membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial mitocondrial; PLALB) membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada e baixo potencial mitocondrial; MAI) membrana acrossomal íntegra, MPI) membrana plasmática íntegra e APM) alto potencial mitocondrial.

2.3. Análise estatística

No experimento 1, os dados da taxa de concepção foram submetidos ao Proc Glimmix do SAS (versão 9.3) para distribuição binária. Os fatores de efeito fixo incluídos no modelo foram fertilidade dos touros e momento da inseminação (h), já de efeito aleatório foi fazenda com $P < 0.05$ considerado significativo. Frequência, médias e desvio padrão foram obtidos com o uso do Proc Freq e Proc Means.

No experimento 2, os resultados obtidos a partir das análises laboratoriais foram testados quanto à normalidade de resíduos e da homogeneidade da variância. Os dados foram analisados com o uso do Proc Glimmix com efeitos fixos os tratamentos (TTR ou P+TTR), grupos (Alta ou Baixa fertilidade) e efeito aleatório as réplicas (1, 2 e 3). Analisou-se também

a interação entre as variáveis. As médias e desvio padrão das variáveis das análises subjetiva, cinética e funcionalidade espermática foram obtidos com o uso do LSMeans. As comparações foram efetuadas com uso do teste Tukey, sendo consideradas significativas quando $P < 0.05$.

3. Resultados

Experimento 1

A taxa de concepção aos 30 dias de vacas taurinas de corte lactantes foi superior para touros de alta fertilidade (49.2%; 113/228) comparado aos touros de baixa fertilidade (38.7%; 90/232; $P= 0.02$). Quando considerada a fertilidade dos touros e o momento da inseminação, a concepção de vacas de corte lactantes aos 30 dias foi similar entre touros de alta fertilidade, tanto às 48 h quanto às 54 h, e também nos touros de baixa fertilidade às 54 h. Entretanto, o índice de 34.5% (113/232) de concepção das fêmeas inseminadas com touros de baixa fertilidade às 48 h foi inferior ($P=0.0065$) aos demais grupos avaliados (Figura 2).

Experimento 2

Na Tabela 2 pode-se visualizar que na avaliação imediata pós-descongelamento houve similaridade nos parâmetros subjetivos, cinética e funcionalidade espermática entre touros de alta e baixa fertilidade.

A análise subjetiva das características espermáticas após teste de termorresistência revelou motilidade subjetiva (MS) similar entre os grupos de touros de alta e de baixa fertilidade ($P=0.49$). Porém, o vigor foi maior no grupo alta fertilidade após TTR, mas não houve diferença entre os grupos de touros de alta e baixa fertilidade após $P+TTR$ ($P= 0.02$; Tabela 3).

Nos resultados das características espermáticas avaliadas pelo sistema SCA houve similaridade na MT, MP, STR, LIN, WOB entre os grupos de alta e baixa fertilidade e

tratamentos (TTR e P+TTR). Os valores de VAP, VCL e VSL no grupo de baixa fertilidade ($P < 0.0003$, $P < 0.0004$ e $P = 0.005$, respectivamente) foram inferiores aos de alta fertilidade. A ALH foi similar entre touros de alta e baixa fertilidade ($P = 0.12$), porém diferiu entre tratamentos ($P < 0.0001$). Após TTR, a maior frequência de batimento (BCF) foi verificada no grupo de touros de alta fertilidade ($P = 0.002$) enquanto que após o P+TTR os grupos de alta e baixa fertilidade foram semelhantes (Tabela 3).

Os resultados da análise da funcionalidade espermática foram similares entre os grupos alta e baixa fertilidade e, também, comparando o grupo TTR e P+TTR quando as características foram agrupadas em PIAIA e PLALB (Tabela 3). Porém, a análise individual das características indicou diferença na MPI entre tratamentos (TTR e P+TTR). No grupo de baixa fertilidade, o APM foi mais baixo no TTR do que no P+TTR, mas essa diferença não foi observada no grupo de alta fertilidade.

4. Discussão

O atraso na inseminação artificial para 54 h após a retirada do dispositivo de progesterona melhora a taxa de concepção de vacas de corte *Bos taurus taurus* lactantes inseminadas com sêmen de baixa fertilidade, não diferindo do índice dos touros de alta fertilidade. Este estudo demonstra que a inseminação realizada mais próxima à ocorrência da ovulação favorece a taxa de concepção dos touros considerados de baixa fertilidade. O incremento na taxa de concepção quando a inseminação artificial é realizada mais próxima à ovulação já foi evidenciado em estudo anterior com vacas leiteiras [26], principalmente quando touros de baixa fertilidade foram utilizados em manejo reprodutivo com observação de estro [27].

A análise convencional do sêmen proposta pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal é subjetiva e determina padrões mínimos para a comercialização do sêmen [30].

Usualmente, apenas estas características avaliadas não diferem entre reprodutores de alta e baixa fertilidade após o descongelamento do sêmen. Entretanto, o nosso estudo demonstrou que touros de baixa fertilidade apresentaram após o TTR menor vigor. O vigor está intimamente relacionado à intensidade de movimento do espermatozoide [31].

Atualmente, a avaliação objetiva pela análise computadorizada do movimento espermático é amplamente utilizada. Nesta análise, o movimento espermático pode ser dividido em parâmetros quantitativos e qualitativos. Os parâmetros VSL, VAP e VCL mensuram o movimento espermático quantitativamente, enquanto LIN, STR, WOB, ALH e BCF definem o movimento qualitativamente [28]. No experimento 2, ficou evidenciado que touros de alta e baixa fertilidade apresentam características similares de qualidade do movimento espermático (STR, LIN, WOB, ALH), porém os touros de alta fertilidade tiveram maiores valores de VSL, VAP e VCL do que os touros de baixa fertilidade. Apenas a frequência do movimento (BCF) apresentou interação entre grupo (alta x baixa) e tratamento (TTR x P+TTR), evidenciando que espermatozoides de touros de baixa fertilidade apresentam menor BCF após TTR em comparação aos touros de alta fertilidade. Características espermáticas avaliadas pelo sistema computadorizado do movimento e sua associação com a fertilidade já foram objeto de pesquisa revelando que a combinação das variáveis da análise computadorizada da motilidade, como a combinação BCF, LIN, VAP, VSL e VCL apresenta alta correlação ($r^2=0,97$) com a fertilidade a campo [29].

O teste da termorresistência é considerado uma avaliação complementar para verificar a qualidade espermática após descongelamento, segundo as normas de comercialização de sêmen bovino [30]. O período de incubação de 3 h a 36°C teve por objetivo identificar diferenças nas características de cinética e funcionalidade espermática de touros de alta e baixa fertilidade, mimetizando a capacidade de sobrevivência espermática no trato reprodutivo da fêmea. Com base nos resultados do presente estudo entendemos que o TTR é

uma potencial ferramenta para análise seminal quando associada à avaliação objetiva do movimento espermático por sistema computadorizado, pois as variáveis VAP, VCL, VSL e BCF foram diferentes entre touros de baixa e alta fertilidade apenas após o TTR.

As técnicas de separação de espermatozoides são essenciais para remover o plasma, agentes crioprotetores e as células espermáticas danificadas [13, 14]. Na nossa pesquisa, a separação espermática associada ao TTR melhorou alguns parâmetros de cinética e funcionalidade, porém não permitiu diferenciação entre touros de alta e baixa fertilidade. Além disso, observou-se que a técnica selecionou espermatozoides com membrana acrossomal íntegra e alto potencial mitocondrial, porém o processo lesionou a membrana plasmática dos espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade.

Em conclusão, o atraso na inseminação artificial em vacas de corte *Bos taurus taurus* lactantes incrementou a taxa de concepção do programa de IATF com touros considerados de baixa fertilidade. Adicionalmente, verificou-se que após TTR os espermatozoides de touros de baixa fertilidade apresentam menor velocidade que espermatozoides de touros de alta fertilidade. Portanto, o atraso na inseminação artificial com sêmen de touros de baixa fertilidade ajusta a inseminação mais próxima à ovulação. Este protocolo provavelmente favorece o uso de sêmen de touros cuja cinética de movimento espermático esteja comprometida, resultando em implemento no índice de concepção do rebanho.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos proprietários das fazendas Nova Querência (São Martinho da Serra, RS, Brasil) e Cabanha Baviera (Quarai, RS, Brasil) por disponibilizar a infraestrutura, mão de obra e animais para o experimento *in vivo*. À Dra Daniela dos Santos Brum e Dr Fábio Gallas Leivas da Universidade Federal do Pampa (Uruguaiana, RS, Brasil) nosso reconhecimento pela cedência da infraestrutura do Laboratório Biotech e equipamentos

para o experimento *in vitro*. À Alta Genetics – Brasil pela doação do sêmen bovino e aos Doutores Manoel Sá Filho e Pedro Monteiro pelo apoio científico e estatístico. À CAPES, que subsidiou a bolsa de estudos da primeira autora pelo PPGMV/UFSM.

Referências

- [1] Meneghetti M, Filho OGS, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. *Theriogenology*. 2009;72:179-189.
- [2] Sá Filho OG, Meneghetti M, Peres RF, Lamb GC, Vasconcelos JL. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*. 2009;72:210-218.
- [3] Baruselli PS, Sales JN, Sala RV, Vieira LM, Sá Filho MF. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. *Animal Reproduction*. 2012;9:139-52.
- [4] Sá Filho MF, Penteadó L, Reis EL, Reis TANPS, Galvão KN, Baruselli PS. Timed artificial insemination early in the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows. *Theriogenology*. 2013;79:625-632.
- [5] Pessoa GA, Martini AP, Carloto GW, Rodrigues MCC, Claro JI, Baruselli PS, Brauner CC, Rubin MIB, Corrêa MN, Leivas FG, Sá Filho MF. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial inseminations protocol. *Theriogenology*. 2015;85:792-799.
- [6] Baruselli PS, Ferreira RM, Sá Filho MF, Bó GA. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. *Animal*. 2018;2(supl.1):45-52.
- [7] ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Index ASBIA 2017. <http://www.asbia.org.br/certificados/index/>
- [8] Arruda RP, Barnabe VH, Alencar MM, Barnabe RC. Evaluation of frozen bull semen. Quick and slow thermoresistance tests: effects on fertility. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 1992;29:131-137.
- [9] Costa MZ, Oliveira LZ, Resende MV, Lucio AC, Perini AP, Miguel MCV. Induction of the acrosome reaction test to *in vitro* estimate embryo production in Nelore cattle. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2010;62:771-777.
- [10] Arruda RP, Celeghini EDC, 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. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2011;35:145-151.
- [11] Al Naib A, Hanrahan JP, Lonergan P, Fair S. *In vitro* assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. *Theriogenology*. 2011;76:161-167.
- [12] Dimitropoulos, E. La signification du test de la thermoresistance dans l'appréciation de la valeur fécondante du sperme congelé. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 1967; 4:215-224.
- [13] Zavos PM. Preparation of human frozen-thawed seminal specimens using the Sperm Prep filtration method: improvements over the conventional swim up method. *Fertility and Sterility*. 1992;57:1326-1330.
- [14] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 2002;57:149-179.

- [15] Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*. 1995;44:859-869.
- [16] 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. *International Journal of Andrology*. 1999;22:253-260.
- [17] Saacke RG, White JM. Semen quality tests and their relationship to fertility. In: *Proceedings of the 4th technical conference on artificial insemination and reproduction*. National Association of Animal Breeders, 1972. p.22-27.
- [18] Amann RP. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of Andrology*. 1989;10:89-98.
- [19] Rodriguez-Martinez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction in Domestic Animals*. 2003;38:312-318.
- [20] Sudano MJ, Crespilho AM, Fernandes CB, Martins Junior A, Papa FO, Rodrigues J, Machado R, Landim-Alvarenga FC. Use of bayesian inference to correlate *in vitro* embryo production and *in vivo* fertility in Zebu bulls. *Veterinary Medicine International*. 2011;2011:1-6.
- [21] Sellem E, Broekhuijse MLW, Chevrier JL, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen EPC. Use of combinations of *in vitro* quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology*. 2015;84:1447-1454.
- [22] Cunha ER, Silva CG, Martins CF. Estudo comparativo dos testes de termo-resistência rápido, lento e fisiológico em sêmen criopreservado bovino importado. *Anais da 49a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. 2012; 1-3.
- [23] Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 1986;25:591-600.
- [24] Guimarães AC, Leivas FG, Santos FW, Schwengber EB, Giotto AB, Machado CI, Gonçalves CG, Folchini NP, Brum DS. Reduction of centrifugation force in discontinuous Percoll gradients increases *in vitro* fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Animal Reproduction Science*. 2014;146:103-110.
- [25] Celeghini ECC, Arruda RP, De Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction Domestic Animal*. 2007;42:479-488.
- [26] Hockey CD, Morton JM, Norman ST, McGowan MR. Improved prediction of ovulation time may increase pregnancy rates to artificial insemination in lactating dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010;45:239-248.
- [27] Macmillan KL, Watson JD. Fertility differences between groups of sires relative to the stage of oestrus at the time of insemination. *Animal Science*. 1975;21:243-249.
- [28] Mortimer ST. CASA - Practical Aspects. *Journal of Andrology*. 2000;21:515-524.
- [29] Farrell, P.B., Presicce, G.A., Brockett, C.C., Foote, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*. 1998;49:871-879.
- [30] CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte - MG. 1998.
- [31] Morani, E.S.C., Rodrigues, L.H., Roncoletta, M. Manual de reprodução nas espécies domésticas: avaliação e empregabilidade do sêmen. São Paulo: Medvet, 2018.

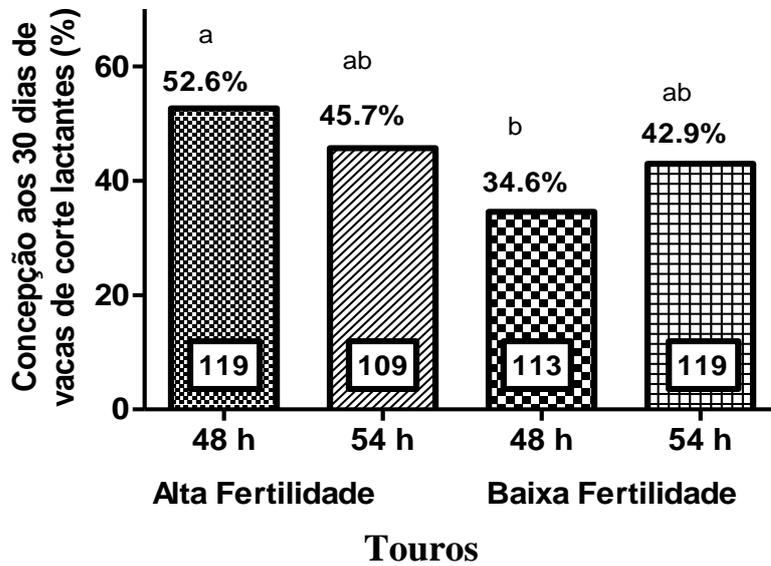


Figura 2. Concepção aos 30 dias após IATF de vacas de corte *Bos taurus taurus* lactantes inseminadas em tempo fixo 48 h ou 54 h após a remoção do implante intravaginal de progesterona com sêmen de alta e baixa fertilidade (P=0.0065).

Tabela 1. Análise descritiva de acordo com a distribuição dos grupos de manejo. Informações sobre as vacas taurinas em grupos de manejo, ECC no início do protocolo de IATF, ciclicidade, demonstração de estro no momento da IA e taxa de prenhez.

Fazendas	Lotes	Vacas n	ECC médio (1 a 5)	Ciclicidade, % (n) ¹	Estro, % (n) ²	P/IA, % (n) ³
A	1	159	2.64 ± 0.29	49.7 (79/159)	73 (116/159)	35.2 (56/159)
	2	72	2.58 ± 0.29	59.1 (39/66) ⁴	72.2 (52/72)	44.4 (32/72)
B	3	158	2.79 ± 0.24	51.9 (82/158)	88.6 (140/158)	49.3 (78/158)
	4	71	2.83 ± 0.41	70.42 (50/71)	87.3 (62/71)	52.1 (37/71)
Total		460	2.72 ± 0.31	54.9 (250/454)	80.4 (370/460)	44.1 (203/460)

¹Presença de corpo lúteo no início do protocolo de IATF.

²Ocorrência de estro entre a retirada da P4 e a IATF.

³Prenhez por IA (P/IA) 30 dias após IATF.

⁴Seis fêmeas não foram avaliadas quanto à ciclicidade.

Tabela 2. Média (\pm Desvio Padrão) das características espermáticas de touros *Bos taurus taurus* avaliadas de forma subjetiva, cinética e funcionalidade espermática nos grupos alta e baixa fertilidade pós descongelamento (0h).

<i>Características espermáticas pós descongelamento (0h)</i>	Alta Fertilidade	Baixa Fertilidade	<i>valor de P</i>
<i>Avaliação Subjetiva</i>			
MS (%)	65.00 \pm 7.34	58.15 \pm 10.48	0.16
Vigor (escore 1-5)	3.00 \pm 0.39	3.11 \pm 0.32	0.97
<i>Cinética espermática</i>			
MT (%)	68.10 \pm 13.79	67.54 \pm 16.06	0.99
MP (%)	53.35 \pm 14.08	51.63 \pm 16.44	0.99
STR (%)	80.61 \pm 5.01	77.94 \pm 5.39	0.78
VSL (μ m/s)	29.18 \pm 8.43	27.97 \pm 7.08	0.99
VCL (μ m/s)	49.22 \pm 9.33	51.35 \pm 10.73	0.98
WOB (%)	72.50 \pm 7.27	68.96 \pm 4.48	0.61
VAP (μ m/s)	35.90 \pm 8.87	35.58 \pm 8.40	0.99
LIN (%)	58.73 \pm 9.05	55.14 \pm 7.44	0.82
ALH (μ m)	2.04 \pm 0.28	2.27 \pm 0.28	0.26
BCF (Hz)	9.41 \pm 0.90	9.49 \pm 0.72	0.99
HYP	74.2 \pm 62.22	97.2 \pm 69.00	0.33
<i>Funcionalidade espermática</i>			
PIAIA (%)	43.60 \pm 8.86	41.95 \pm 12.16	0.99
PLALB (%)	28.30 \pm 9.00	26.18 \pm 11.55	0.95
APM (%)	45.32 \pm 9.34	42.19 \pm 11.18	0.90
MPI (%)	55.38 \pm 11.62	60.87 \pm 15.78	0.74
MAI (%)	67.65 \pm 8.02	67.53 \pm 8.80	1.00

Legenda: MS: motilidade subjetiva; Sptz total: espermatozoides totais; MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; STR: Retilinearidade; LIN: Linearidade; VSL: Velocidade progressiva; VCL: Velocidade curvilínea; VAP: Velocidade de trajeto; WOB: Movimento oscilatório; ALH: amplitude lateral da cabeça; BCF: Frequência de batimento; HYP: hiperativos; PIAIA: membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial mitocondrial; PLALB: membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada e baixo potencial mitocondrial; APM: alto potencial mitocondrial; MPI: membrana plasmática íntegra; e MAI: membrana acrossomal íntegra.

Tabela 3. Média (\pm Desvio Padrão) das características espermáticas de touros *Bos taurus taurus* avaliadas de forma subjetiva, cinética e funcionalidade espermática nos grupos de alta e baixa fertilidade pós TTR fisiológico (TTR) e pós seleção espermática e TTR (P+TTR).

<i>Características espermáticas</i>	Alta fertilidade		Baixa fertilidade		<i>valor de P</i>		
	TTR	P+TTR	TTR	P+TTR	Tratamento	Grupo	Trat*Grupo
<i>Avaliação Subjetiva</i>							
MS (%)	49.07 \pm 8.77	27.03 \pm 9.12	33.14 \pm 11.77	25.55 \pm 13.03	0.33	0.49	0.68
Vigor (1-5)	2.95 \pm 0.35 ^a	3.03 \pm 0.19 ^a	2.45 \pm 0.50 ^b	2.85 \pm 0.36 ^a	0.0007	0.003	0.02
<i>Cinética espermática</i>							
MT (%)	47.10 \pm 15.40	28.70 \pm 12.71	33.09 \pm 14.31	24.35 \pm 7.78	0.49	0.53	0.66
MP (%)	34.60 \pm 12.04	13.98 \pm 8.01	18.93 \pm 11.24	9.90 \pm 5.79	0.39	0.49	0.70
STR (%)	69.84 \pm 4.65	83.86 \pm 6.63	70.91 \pm 9.10	78.86 \pm 11.30	0.18	0.86	0.67
VSL (μ m/s)	21.99 \pm 4.66 ^b	27.30 \pm 9.20 ^a	16.60 \pm 6.83 ^c	22.85 \pm 11.07 ^{ab}	0.001	0.0058	0.78
VCL (μ m/s)	50.75 \pm 8.76 ^a	44.81 \pm 11.12 ^b	38.49 \pm 9.86 ^c	37.84 \pm 10.45 ^c	0.11	0.0004	0.20
WOB (%)	61.68 \pm 3.61	76.21 \pm 12.12	59.33 \pm 4.7	69.04 \pm 11.25	0.15	0.45	0.59
VAP (μ m/s)	31.33 \pm 5.63 ^a	32.72 \pm 9.65 ^a	23.02 \pm 6.87 ^b	27.89 \pm 11.05 ^{ab}	0.07	0.0003	0.32
LIN (%)	43.19 \pm 4.95	64.55 \pm 14.29	42.35 \pm 8.03	55.50 \pm 18.50	0.08	0.61	0.67
ALH (μ m)	2.65 \pm 0.30 ^a	2.10 \pm 0.46 ^b	2.40 \pm 0.47 ^a	2.03 \pm 0.42 ^b	<0.0001	0.12	0.23
BCF (Hz)	10.00 \pm 1.34 ^a	7.73 \pm 1.11 ^b	8.20 \pm 1.88 ^b	7.83 \pm 1.56 ^b	<0.0001	0.01	0.002
<i>Funcionalidade espermática</i>							
PIAIA (%)	34.49 \pm 8.5	35.88 \pm 10.75	28.15 \pm 11.63	35.55 \pm 10.10	0.70	0.77	0.79
PLALB (%)	31.65 \pm 8.5	20.27 \pm 9.2	30.47 \pm 13.57	19.01 \pm 6.4	0.40	0.90	0.98
APM (%)	36.06 \pm 8.64 ^{ab}	41.85 \pm 9.83 ^b	29.41 \pm 11.64 ^a	41.00 \pm 9.70 ^b	0.001	0.16	0.03
MPI (%)	53.06 \pm 12.82 ^a	46.50 \pm 15.92 ^b	56.34 \pm 19.18 ^a	48.82 \pm 13.70 ^b	0.002	0.23	0.95
MAI (%)	55.98 \pm 5.96 ^a	73.96 \pm 9.30 ^b	54.80 \pm 8.01 ^a	74.77 \pm 6.58 ^b	0.0001	0.76	0.0001

Nota: Valores de $P < 0,05$ indicam diferença.

Legenda: MS: motilidade subjetiva; Sptz total: espermatozoides totais; MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; STR: Retilinearidade; LIN: Linearidade; VSL: Velocidade progressiva; VCL: Velocidade curvilínea; VAP: Velocidade de trajeto; WOB: Movimento oscilatório; ALH: amplitude lateral da cabeça; BCF: Frequência de batimento; HYP: hiperativos; PIAIA: membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial mitocondrial; PLALB: membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada e baixo potencial mitocondrial; APM: alto potencial mitocondrial; MPI: membrana plasmática íntegra; e MAI: membrana acrossomal íntegra.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método mais representativo de estimar a fertilidade de um touro é por meio de resultados de fertilidade testada em rebanhos no campo (ZHANG et al., 1999), ou seja, *in vivo*. Deste modo, o *manuscrito 1* evidenciou que pode haver diferentes taxas de concepção utilizando diferentes partidas de touros na IATF, inclusive com resultados muito abaixo da média geral, embora estes touros fossem liberados para IA com os padrões mínimos exigidos pelo CBRA. Do mesmo modo, a pesquisa do *manuscrito 2 (experimento 1)* demonstra que a alteração do momento da inseminação pode gerar resultados similares em taxa de concepção de touros de alta e baixa fertilidade. Este estudo confirma que a inseminação realizada mais próxima à ocorrência da ovulação favorece a taxa de concepção dos touros considerados de baixa fertilidade. Estudos anteriores com vacas leiteiras comprovaram que houve incremento na taxa de concepção quando a inseminação artificial foi realizada mais próxima à ovulação (HOCKEY et al., 2010), principalmente quando touros de menor fertilidade foram utilizados em manejo reprodutivo com observação de estro (MACMILLAN et al., 1975). Este procedimento seria uma alternativa para otimização do uso de touros de baixa fertilidade, porém de alto valor genético.

Como visto anteriormente, os parâmetros básicos avaliados na análise convencional do sêmen congelado podem não refletir a real taxa de fertilidade do sêmen obtida no campo, principalmente devido à complexidade dos espermatozoides e do processo de fertilização (ARRUDA et al., 1992; COSTA et al., 2010). Em nosso estudo (*manuscrito 2 - experimento 2*) verificamos similaridade na qualidade seminal entre touros de alta e baixa fertilidade no pós-descongelamento imediato tanto na análise convencional, computadorizada ou por sondas fluorescentes. Entretanto, no *manuscrito 2 (experimento 2)* foram constadas diferenças nos parâmetros de qualidade seminal quando os tratamentos teste de termorresistência e seleção espermática foram conduzidos. Assim foi possível comprovar que touros de baixa fertilidade são inferiores aos touros de alta fertilidade quanto aos parâmetros quantitativos de movimento espermático (VSL, VCL e VAP).

Avaliações de correlação do reprodutor têm sido o tema de muitos estudos (SAACKE & WHITE, 1972; AMANN, 1989; ZHANG et al., 1999; RODRIGUEZ MARTINEZ, 2003; SUDANO et al., 2011). Nesse sentido é de grande importância identificar testes laboratoriais que apresentem alta relação com os resultados *in vivo*. Portanto, mais estudos com o enfoque no estabelecimento de associações entre a qualidade seminal *in vitro* e a fertilidade *in vivo* deverão contribuir para o desenvolvimento de estratégias que melhorem resultados da IATF identificando touros de alta fertilidade que resultam em alto desempenho reprodutivo.

6 CONCLUSÕES

No *manuscrito 1*, ficou demonstrado que existe variação individual na fertilidade de touros utilizados em programas de IATF em rebanhos taurinos. Verificou-se diferença na taxa de concepção com o uso de diferentes partidas de sêmen de um mesmo reprodutor. Adicionalmente, confirmou-se que a demonstração de estro e o escore de condição corporal são dados essenciais que devem ser criteriosamente analisados nos programas de IATF, pois a ausência de estro e baixo escore de condição corporal diminuem a taxa de concepção.

No *manuscrito 2* pode-se identificar que o sêmen de touros de baixa fertilidade apresenta menor qualidade espermática em termos de velocidade de deslocamento, na avaliação pelo método computadorizado após teste de termorresistência em comparação aos touros de alta fertilidade. Houve incremento na taxa de concepção destes touros quando a IATF foi atrasada para 54 h após a remoção do dispositivo de progesterona, isto é, mais próxima à ovulação.

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.161-167, 2011.

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v.10, n.2, p.89-98, 1989.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O. V., J. L. (Ed.). **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, cap. 80, p.717-718, 1993.

ARIAS, M.E.; ANDARA, K.; BRIONES, E.; FELMER, R. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. **Reproduction Biology**, v.17, p.126-132, 2017.

ARRUDA, R.P.; BARNABE, V.H.; ALENCAR, M.M.; BARNABE, R.C. Evaluation of frozen bull semen. Quick and slow thermoresistance tests: effects on fertility. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, n.1, p. 131-137, 1992.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.D.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.145-151, 2011.

BALL B.A.; VO A.T.; BAUMBER J. Generation of reactive species by equine spermatozoa. **American Journal Veterinary Research**, v.62, n.4, p.508-515, 2001.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BÓ, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.479-486, 2004.

BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.S.; SALA, R.V.; VIEIRA, L.M.; SÁ FILHO, M.F. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.139-152, 2012.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, v.25, n.7, p.383-391, 1972.

BRITO, L.F.; SILVA, A.E.; RODRIGUES, L.H.; VIEIRA, F.V.; DERAGON, L.A.; KASTELIC, J.P. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and

semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, v.70, n.3, p.181-190, 2002.

CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBINS, E.Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v.14, p.289–297, 1993.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 48p.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte, 2013. 104p.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; DE ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. 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.

COSTA, M.Z.; OLIVEIRA, L.Z.; RESENDE, M.V.; LUCIO, A.C.; PERINI, A.P.; MIGUEL, M.C.V. Induction of the acrosome reaction test to in vitro estimate embryo production in Nelore cattle. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.4, p.771-777, 2010.

CREPALDI, G.A.; SALES, J.N.S.; GIROTTO, R.W.; AYRES, H.; SALLA-CARDOSO, P.B.; FARIA JUNIOR, S.P.; BARUSELLI, P.S. Rate and timing of ovulation and pregnancy rate in Nelore cows treated with estradiol cypionate or benzoate to induce ovulation on FTAI protocols. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36 (Supl. 2), p.222, 2008.

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? **Veterinaria e Zootecnia**, v.16, p.335-342, 2009.

CROSS, N.L.; WATSON, S.K. Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. **Theriogenology**, v.42, p.89-98, 1994.

DEJARNETTE, J.M., MARSHALL, C.E., LENZ, R.W., MONKE, D.R., AYARS, W.H., SATTTLER, C.G. Sustaining the fertility of artificially inseminated dairy cattle: the role of the artificial insemination industry. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.E93-E104, 2004.

DHINESH KUMAR, R.; THULASIRAMAN, P.; CHANDRASEKAR, T.; GOPI, M.; MANOBHAVAN, M.; SATHIYA BARATHI, M.; AASIF AHMAD SHEIKH. Semen metabolomics as biomarker for reproductive efficiency in dairy animals. **Indian Farmer**, v.2, n.7, p.538-542, 2015.

DONELLY, E.T.; O'CONNELL, M.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15, n.7, p.1552-1561, 2000.

DIMITROPOULOS, E. La signification du test de la thermoresistance dans l'appréciation de la valeur fécondante du sperme congelé. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v.4, p.215-24, 1967.

EDDY, E.M.; O'BRIEN D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E; NEIL, J. D. (Ed.). **The Physiology of Reproduction**. 2ed. New York: Raven Press, cap. 2, p.29-77, 1994.

FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v.49, p.871-879, 1998.

FLESH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, p.197-235, 2000.

FOOTE, R.H. Time of artificial insemination and fertility in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.62, n.2, p.355-358, 1979.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.P.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. **Biology of Reproduction**, v.34, p.127-138, 1996.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1401-1406, 1997.

GRAHAM J.K.; KUNZE E.; HAMMERSTEDT RH. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.43, p.55-64, 1990.

GOMES, R.C.; FEIJÓ, G.L.D.; CHIARI, L. Evolução e qualidade da pecuária brasileira. **Nota técnica. EMBRAPA**, p.1-4, 2017.

HAE-LEE LEE, SUE-HEE KIM, DONG-BEOM JI, YONG-JUN KIM. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **Journal of Veterinary Science**, v.10, p.249-255, 2009.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p.73-88, 1990.

HAUGLAND, R.P. **Handbook of fluorescent probes and research chemicals**. 8^a Ed. Molecular Probes, 2001. 234p.

HENKEL, R. Sperm preparation: state-of-the-art physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. **Asian Journal of Andrology**, v.14, p.260-269, 2012.

HOCKEY, C.D.; MORTON, J.M.; NORMAN, S.T.; MCGOWAN, M.R. Improved prediction of ovulation time may increase pregnancy rates to artificial insemination in lactating dairy cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.239-248, 2010.

LAMBERT, W.V.; MCKENZIE, F.F. Artificial Insemination in Livestock Breeding. **Circular. United States Department of Agriculture**, n.567, 1940

LINDEMANN, C.B.; FISHER, M.; LIPTON, M.A comparative study of the effects of freezing and frozen storage on intact and demembrated bull spermatozoa. **Cryobiology**, v.19, p.20-28, 1982.

MACMILLAN, K.L.; WATSON, J.D. Fertility differences between groups of sires relative to the stage of oestrus at the time of insemination. **Animal Science**, v.21, p.243-249, 1975.

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v.72, p.179–189, 2009.

MORADO, S.; PEREYRA, V.; BREININGER, E.; SARA, R.; CETICA, P. Study of Sperm Evaluation Parameters to Estimate Cryopreserved Bovine Semen Fertility. **Austin Journal Veterinary Science & Animal Husbandry**, v.2, n.1, p.1005, 2015.

MORANI, E.S.C.; RODRIGUES, L.H.; RONCOLETTA, M. **Manual de reprodução nas espécies domésticas: avaliação e empregabilidade do sêmen**. São Paulo: Medvet, 2018. 213p.

MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.11, p.25-30, 1999.

MORTIMER, S.T. CASA - Practical Aspects. **Journal of Andrology**, v.21, p.515-524, 2000.

OURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review Cytology**, v.122, p.105–151, 1990.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, n.6, p.859-869, 1995.

PERRY, G.A.; SMITH, M.F.; ROBERTS, A.J.; MACNEIL, M.D.; GEARY, T.W. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v.85, n.3, p.684-689, 2007.

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v.30, p.4480-4486, 1991.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, n.4, p.312-318, 2003.

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

ROELOFS, J.B.; GRAAT, E.A.M.; MULLAART, E.; SOEDE, N.M.; VOSKAMP-HARKEMA, W.; KEMP, B. Effects of insemination–ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. **Theriogenology**, v.66, p.2173–2181, 2006.

SAACKE, R.G., WHITE, J.M., 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. In: **Proceedings of the 4th technical conference on artificial insemination and reproduction**. National Association of Animal Breeders, p.22-27, 1972.

SAACKE, R.G. Semen quality in relation to semen preservation. **Journal of Dairy Science**, v.66, n.12, p.2635-2644, 1983.

SAACKE, R.G. Insemination factors related to timed AI in cattle. **Theriogenology**, v.70, p.479-484, 2008.

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.

SÁ FILHO, M.F.; CRESPILO, A.M.; SANTOS, J.E.P.; PERRY, G.A.; 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, p.23-30, 2010.

SELLEM, E., BROEKHUIJSE, M.L.W.; CHEVRIER, J.L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT, E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E.P.C. Use of combinations of *in vitro* quality assessments to predict fertility of bovine semen. **Theriogenology**, v.84, n.9, p.1447-1454, 2015.

SHANNON, P.; CURSON, B. Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v.55, p.614-620, 1972.

SUDANO, M.J.; CRESPILO, A.M.; FERNANDES, C.B.; MARTINS JUNIOR, A.; PAPA, F.O.; RODRIGUES, J.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Use of bayesian inference to correlate *in vitro* embryo production and *in vivo* fertility in Zebu bulls. **Veterinary Medicine International**, n.11, p.1-6, 2011.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62, n.7, p.1245-1252, 2004.

TRIMBERGER, G.W. Breeding efficiency in dairy cattle from artificial insemination at various intervals before and after ovulation. **Research Bulletin of Nebraska Agricultural Experiment Station of Nebraska**, n.153, p.3-25, 1948.

UTT, M.D. Prediction of bull fertility. **Animal Reproduction Science**, v.169, p.37-44, 2016.

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

VIANNA, F.P.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; MELO, C.M.; DELL'AQUA JR, J.A. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. **Animal Reproduction Science**, v.113, p.279-282, 2009.

VINCENT, P.; UNDERWOOD, S.L.; DOLBEC, C.; BOUCHARD, N.; KROETSCH, T.; BLONDIN, P. Bovine semen quality control in artificial insemination centers. **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.153-165, 2012.

ZAVOS, P.M. Preparation of human frozen-thawed seminal specimens using the Sperm Prep filtration method: improvements over the conventional swim up method. **Fertility and Sterility**, v.57, p.1326–1330, 1992.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M.G.H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. **International Journal of Andrology**, v.22, n.4, p.253-260, 1999.

APÊNDICE A

Resumo publicado no 12º Simpósio Internacional de Reproducción Animal em Cordoba - Argentina em 2017.

TIMING OF INSEMINATION ALTER THE PREGNANCY PER AI FROM BULLS OF HIGH AND LOW FERTILITY?

Ana Paula Martini¹, Gilson Antonio Pessoa¹, Eliana Burtet Parmeggiani¹, Mariani Farias Fiorenza¹, Aline Policarpo Baioco¹, Manoel Francisco Sá Filho², Mara Iolanda Batistella Rubin¹

¹ Universidade Federal de Santa Maria, ² Alta Genetics do Brasil

E-mail: ananaulamartini87@yahoo.com.br

The aim of this study was compare the effect of moment of AI with bulls of high and low fertility on pregnancy rates in *Bos taurus* cows submitted to artificial insemination (AI) 48 or 54h after intravaginal progesterone device (CIDR®, Zoetis, Brazil) removal using timed artificial insemination (TAI) protocol. The experiment was conducted on two commercial farms located in Rio Grande do Sul, Brazil, during the 2016-2017 breeding season. Suckling beef cows (n=460) with body condition score of 2.72 ± 0.1 (1 = emaciated, 5 = obese) were distributed randomly in two synchronization groups: AI 48h (n=232) or AI 54h (n=228) after CIDR removal. On D0, uterus and ovaries were examined by transrectal ultrasound to detect the cyclicity, i.e. presence of *Corpus luteum*. After ultrasound evaluation all cows were injected with 2 mg of estradiol benzoate im (Gonadiol®, Zoetis), and a CIDR was inserted. On D8, 12.5 mg of dinoprost tromethamine im (Lutalyse®, Zoetis) was given, and the CIDR was removed. Just after this procedure 0.6 mg of estradiol cypionate (ECP®, Zoetis) and 400 IU of Equine Chorionic Gonadotropin (eCG, Novormon®, Zoetis) were injected. The TAI was performed on D10 (48 or 54h CIDR removal) using six bulls, being three bulls of high fertility and three bulls of low fertility, also three different batches by bull. Pregnancy diagnosis was performed on D40 (30 days after TAI). Data was analyzed using Glimmix procedure, and frequency procedure on the statistical program SAS. The pregnancy rate was higher for cows inseminate with high fertility bull (49.17%, 113/228) than low fertility bull (38.69%, 90/232) (P=0.02) regardless of insemination protocol. However the pregnancy rate was similar for cows inseminate at 48h (43.38%, 104/232) and 54h (44.35%, 99/228) (P=0.83). The pregnancy rate from high and low fertility bulls semen used at different insemination moment (48 or 54h) is showing in Figure 1.

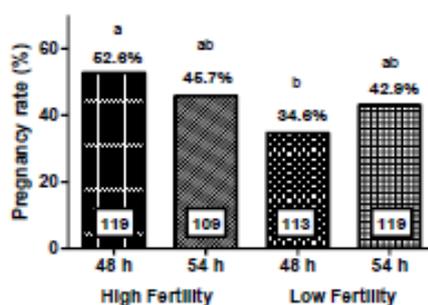


Figure 1. Pregnancy rate from high and low fertility bulls semen used at 48 or 54h after intravaginal progesterone device removal (P=0.0065).

In conclusion, bulls considered of high fertility showed higher pregnancy rates compared to bulls of low fertility. However the pregnancy rate was higher in bulls considered low fertility when artificial insemination was performed at 54h than at 48h after P4 removal.

Acknowledgment: Fazenda Baviera e Fazenda Nova Querência, Alta Genetics e Capes.

APÊNDICE B

Resumo publicado na 32ª Jornada Acadêmica Integrada da UFSM em 2017



32ª Jornada Acadêmica Integrada



AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO SÊMEN CONGELADO BOVINO DE ALTA E BAIXA FERTILIDADE

Baioco, Aline P.¹(GR); Martini, Ana P.¹(PG); Parmeggiani, Eliana B.¹(PG); Pessoa, Gilson A.¹(CO); Rubin, Mara I B.¹(O)

¹ Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria

O estudo teve como objetivo verificar a influência do momento da IA em 48 ou 54h após a retirada do implante de progesterona sobre a taxa prenhez com uso de touros considerados de alta e baixa fertilidade. Os reprodutores foram selecionados pela fertilidade através do programa Concept Plus Corte da empresa Alta Genetics. O experimento foi desenvolvido em duas fazendas de corte localizadas no interior de São Martinho da Serra/RS e Quaraí/RS, durante a temporada reprodutiva de 2016-2017. O sêmen congelado de 6 touros foram avaliados em teste *in vivo* através de programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). As vacas de corte com cria ao pé (n = 460) apresentando escore de condição corporal de $2,72 \pm 0,1$ (1 = magro, 5 = obeso) foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos de sincronização: IA 48h (n = 232) ou IA 54h (n = 228) após a remoção do dispositivo de progesterona intravaginal (CIDR®, Zoetis, Brasil). No dia zero (D0), previamente ao início do protocolo de sincronização foi realizado exame ultrassonográfico transretal do trato reprodutivo das fêmeas para avaliação da ciclicidade (presença de corpo lúteo). Após, todas as vacas receberam protocolo de sincronização do estro com benzoato de estradiol (2 mg, im, Gonadiol®, Zoetis) e um CIDR foi inserido. No D8, administrou-se dinoprost trometamina (12,5 mg, im, Lutalyse®, Zoetis), cipionato de estradiol (0,6 mg, im, ECP®, Zoetis) e gonadotrofina coriônica equina (400 UI, im, eCG, Novormon®, Zoetis) além da remoção do CIDR. No D10 (48 ou 54 h após a remoção do CIDR), a IATF foi realizada com o sêmen de três touros de alta fertilidade e três touros de baixa fertilidade. As palhetas de sêmen de todas as partidas dos 6 touros foram distribuídas igualmente entre os lotes da manhã (48h) e da tarde (54h). O diagnóstico de gestação por ultrassonografia transretal foi realizado no D40 (30 dias após IA). Os dados foram analisados usando o procedimento Glimmix e o procedimento de frequência do SAS. A taxa de concepção de touros de baixa fertilidade foi de 38,69% (90/232) sendo inferior aos dados obtidos de touros de alta fertilidade que resultaram na taxa de concepção de 49,17% (113/228; P<0,05). A alta e baixa fertilidade foram confirmadas independentemente do momento de inseminação (48 ou 54h). Em relação ao momento da inseminação, a taxa de concepção foi semelhante entre as vacas inseminadas às 48h (43,38%; 104/232) e às 54h (44,35%; 99/228; P> 0,83). No entanto, a taxa de concepção de touros de baixa fertilidade às 48h (34,6%; 40/113) foi inferior aos demais tratamentos. A taxa de concepção de touros de baixa fertilidade às 54h (42,9%; 50/119) foi semelhante aos touros de alta fertilidade tanto às 48h (52,6%; 64/119) quanto às 54h (45,7%; 49/109; P<0,01). Os resultados comprovam que touros considerados de alta fertilidade apresentam maiores taxas de concepção em comparação com touros de baixa fertilidade. No entanto, a taxa de concepção de vacas inseminadas com touros de baixa fertilidade às 54h foi similar aos touros de alta fertilidade tanto às 48h quanto às 54h após a remoção do CIDR.

Pesquisa apoiada pela Cabanha Baviera e Fazenda Nova Quorência, Alta Genetics e Capes.