



Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos

Impact of semen quality on field fertility in cattle

Eneiva Carla Carvalho Celeghini^{1,3}, Rubens Paes de Arruda², Shirley Andrea Florez-Rodriguez¹, Felipe Barbosa dos Santos¹, Maíra Bianchi Rodrigues Alves¹, Bruna Marcelle Martins de Oliveira¹

¹Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução, Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

²Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

³Correspondência: celeghin@usp.br

Resumo

A fertilização envolve um processo complexo e requer muitos atributos espermáticos para seu sucesso. Há uma grande variação no sêmen de diferentes touros e partidas, o que causa uma oscilação no potencial de fertilidade. A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) utilizando partidas de sêmen com reduzido potencial de fertilidade causa um grande impacto na produtividade do rebanho. Partidas de sêmen que apresentam características de motilidade progressiva, vigor, defeitos morfológicos e concentração dentro das aceitáveis para o uso na IA podem mostrar deficiência no potencial de fertilidade, o que pode ser atribuído a alterações em estruturas ou funções espermáticas não contempladas nestas avaliações. Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas buscando a identificação de alterações espermáticas que resultam em falha na fertilidade; revelando com mais precisão lesões nas células espermáticas após o processo de criopreservação. Este texto visa abordar, baseados principalmente em nossas experiências, as falhas de fertilidade inerentes ao sêmen e o quanto as técnicas laboratoriais podem prever sobre o potencial de fertilidade de uma partida de sêmen antes do uso na IATF e seu impacto sobre a fertilidade do rebanho.

Palavras-chaves: espermatozoides, criopreservação, sondas fluorescentes, citometria de fluxo, CASA.

Abstract

Fertilization involves a complex process and requires many sperm attributes for its success. There is great variation in the semen of different bulls and batch, which causes an oscillation in fertility potential. The use in TAI of semen batch with reduced fertility potential causes a great impact on the productivity of the herd. Semen batches that exhibit characteristics of progressive motility, vigor, morphological defects and concentration within those acceptable for use in AI may show reduction in fertility potential, which may be attributed to changes in structures or sperm functions not contemplated in these evaluations. Several techniques have been developed to identify sperm alterations that result in failure of fertility; revealing more accurately sperm cell lesions after the cryopreservation process. This paper aims to address, essentially based on our experiences, fertility failures inherent to semen and how laboratory techniques can predict the fertility potential of a semen batch prior to use in TAI and its impact on herd fertility.

Keywords: sperm, cryopreservation, fluorescent probes, flow cytometry, CASA.

Introdução

No panorama mundial da bovinocultura, o Brasil aparece em destaque, como o segundo maior produtor de bovinos e o maior exportador de carne, com um efetivo constituído por mais de 200 milhões de cabeças, sendo 135,4 milhões de bovinos de corte (ANUALPEC, 2015). Apesar dos números, a produtividade do rebanho depende principalmente do potencial genético e da fertilidade. Neste contexto, a inseminação artificial (IA) figura como uma biotécnica importante na aceleração do ganho genético, e sua aplicação vem ganhando destaque na bovinocultura nacional em função do avanço no desenvolvimento de protocolos hormonais para o uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (Baruselli et al., 2004; Sá Filho et al., 2010). Com isso, houve um impulso na comercialização de doses de sêmen, em 14 anos aumentou mais de 100%, sendo que no ano 2000 foram comercializadas cinco milhões de doses de sêmen e em 2014 mais de 13 milhões de doses, representando a proporção de 59% para gado de corte e 41% para gado de leite (ASBIA, 2014). O emprego de bons programas de seleção e aumento da produção, fez com que o Brasil ganhasse destaque também no segmento de genética bovina, com previsão para 2017 de aumento de 20% nas exportações de sêmen, com tendência para continuar alta nos próximos cinco anos. Segundo dados do Ministério da Indústria, Comércio, Exterior e Serviços, as exportações em 2016 chegaram a uma movimentação financeira de US\$1.495.530



(ASBIA, 2017).

Embora, seja nítido o crescente aumento na comercialização do sêmen criopreservado, ainda são observadas perdas significativas do potencial de fertilização provocadas pelo processo de criopreservação espermática (Curtis et al., 1998; Medeiros et al., 2002; Fuerst-Waltl et al., 2006; Celeghini et al., 2008). O processo de criopreservação pode causar danos aos espermatozoides, que refletem em decréscimo de aproximadamente 50% da motilidade espermática (Hamersted et al., 1990; Thomas et al., 1998; Celeghini et al., 2008) e quando considerada a integridade das membranas espermáticas esta queda pode ser mais acentuada, chegando a mais de 60% (Celeghini et al., 2008).

A relação da qualidade do sêmen com a fertilidade é um dos pontos mais importantes do sistema de produção (Januskauskas et al., 2001). A fertilização envolve um processo complexo (Ôura; Toshimori, 1990), que para a célula espermática ser capaz de completar sua função, precisa, além de alcançar o local de fertilização, penetrar o ovócito e ativar o desenvolvimento embrionário (Braundmeier; Miller, 2001), o que requer muitos atributos dos espermatozoides (Arruda et al., 2011). Desta forma, o método mais seguro para mensurar a fertilidade do sêmen é por meio da taxa de prenhez (Larsson; Rodriguez-Martinez, 2000; Arruda et al., 2011). Visto que o potencial de fertilidade do sêmen além de variar entre touros, varia entre ejaculados, seria impraticável obter o índice de fertilidade antes de liberar uma partida de sêmen para o uso na IATF. Por outro lado, o uso de partidas de sêmen com reduzido potencial de fertilidade pode causar impacto importante na fertilidade do rebanho, causando grandes prejuízos econômicos. Assim, um grande número de grupos de pesquisa e empresas de comercialização de sêmen do mundo tem envidado esforços na busca de avaliações laboratoriais que contribuam com técnicas para identificar partidas de sêmen que possam refletir em redução do potencial de fertilidade antes de sua utilização.

No Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), estão apresentadas algumas características mínimas que uma palheta de sêmen bovino deve ter para ser considerada apta para comercialização e uso na IA, incluindo motilidade progressiva, vigor, defeitos morfológicos e concentração espermática por palheta. Na maioria das vezes, estas características ajudam na triagem de partidas de sêmen que poderão resultar em falhas de fertilidade. Por outro lado, algumas partidas que apresentam excelentes resultados para estas características, quando usadas na IA mostram deficiência no potencial de fertilidade, o que pode ser atribuído a alterações em estruturas ou funções espermáticas não contempladas nas avaliações realizadas.

Este texto visa abordar, baseados principalmente em nossas experiências, as falhas de fertilidade inerentes ao sêmen e o quanto as técnicas laboratoriais podem predizer sobre o potencial de fertilidade de uma partida de sêmen antes do uso na IATF e qual seu impacto no sistema de produção.

Técnicas de avaliações espermáticas para detectar danos da criopreservação

A qualidade do sêmen depende da integridade e função de todas as estruturas que compõem a célula espermática, tais como membrana plasmática, flagelo, mitocôndrias, acrossomo e cromatina, as quais são geralmente avaliadas por técnicas separadas, que nem sempre correspondem à capacidade fecundante do espermatozoide (Arruda et al., 2011). Celeghini et al. (2007) validaram técnicas cujos protocolos baseiam-se em associar sondas fluorescentes para avaliar simultaneamente membrana plasmática, acrossoma e função mitocondrial, esta associação permite a identificação de uma população de espermatozoides apresentando integridade de membrana plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA).

A associação de iodeto de propídio (PI), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA) e MitoTracker Green FM[®] (MITO), resulta em marcações bastante consistentes dos espermatozoides bovinos, tornando fácil a identificação das estruturas. Entretanto, o MITO se apresenta como uma sonda que marca todas as mitocôndrias apresentando um nuance mais brilhante para aquelas com potencial mitocondrial, o que confere certa subjetividade à técnica (Celeghini et al., 2007). Neste sentido, buscando aperfeiçoar a técnica, outros dois protocolos foram desenvolvidos e validados para o sêmen bovino, um associando PI, Hoesch 33342 (H342), FITC-PSA e fenil-2,3,5,6,11,12,14,15 octahidro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino-8H xantílio (CMXRos, MitoTracker Red[®]), e outro associando PI, H342, FITC-PSA e iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), e apresentaram resultados consistentes. Neste último protocolo o JC-1, utilizado para avaliar a função mitocondrial, permitiu separar duas populações de células por códigos de cores, com alto (vermelho-alaranjado) e baixo (verde) potencial de membrana mitocondrial (Celeghini et al., 2007).

Depois de validadas, as técnicas foram utilizadas para avaliar os efeitos da criopreservação sobre estas estruturas. No trabalho de Forero-Gonzalez et al. (2012) foram testados diferentes crioprotetores e curvas de congelamento para o sêmen bovino, notou-se que o grupo controle embora apresentasse motilidade variando de $30,50 \pm 1,06\%$ a $30,67 \pm 1,41\%$; mostrou percentuais de $14,82 \pm 1,49\%$ a $15,83 \pm 1,26\%$ para a população PIAIA, quando se utilizou a associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e MITO citada por Celeghini et al. (2007). Para avaliar os efeitos da criopreservação do sêmen bovino em dois diluidores comerciais, Celeghini et al. (2008) utilizaram outra associação das sondas fluorescentes PI, H342, FITC-PSA e JC-1, também descrita por Celeghini et al. (2007). Neste trabalho notou-se que a motilidade total do sêmen *in natura* ($79,9 \pm 1,3\%$) foi

semelhante ao percentual de células PIAIA ($72,0 \pm 1,4\%$). Contudo, após a criopreservação, notou-se melhor preservação da motilidade do que do percentual de células PIAIA em ambos os diluidores. Verificou-se para o diluidor Botu-Bov $40,1 \pm 1,9\%$ de motilidade e apenas $28,8 \pm 1,1\%$ de células PIAIA; enquanto para Bioxcell a motilidade foi de $24,1 \pm 1,4\%$ e o percentual de espermatozoides PIAIA de $18,1 \pm 0,9\%$. Os resultados apresentados foram obtidos de sêmen de touros da raça Simental, mantidos para experimentação, sem nenhum teste de congelabilidade. Desta forma, pode-se observar que a congelção do sêmen promoveu uma queda mais acentuada nas características de membrana do que àquela observada para motilidade.

Relação da qualidade do sêmen e a fertilidade *in vivo*

Os trabalhos de Celeghini et al. (2008) e Forero-Gonzalez et al. (2012) revelaram que a associação de sondas fluorescentes permite detectar com mais precisão lesões nas células espermáticas após o processo de criopreservação do sêmen. Contudo, ainda não estava definida sua importância na fertilidade e qual deveria ser o número mínimo de espermatozoides PIAIA necessário por dose inseminante para se obter sucesso na fertilização. O que se notava, era que algumas partidas de sêmen, mesmo apresentando características dentro dos padrões definidos no Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), resultavam em falhas na fertilidade quando aplicadas na IA a campo.

Assim, um estudo foi iniciado, utilizando partidas de sêmen comerciais aprovadas para o uso na IA e que apresentavam características similares dentre as avaliações convencionais (motilidade, concentração e morfologia espermáticas), mas que diferiam apenas no percentual de células PIAIA (Oliveira et al., 2014). Neste estudo, foi utilizada a técnica de associação de sondas fluorescentes descrita por Celeghini et al. (2007) para separar três partidas de sêmen, contendo 8,5% (grupo R, n = 58); 23,0% (grupo M, n = 56) e 44,5% (grupo B, n = 68) de espermatozoides PIAIA de um mesmo touro, que foram submetidas à IATF, e resultaram em diferença na fertilidade, notando-se que quanto maior o percentual de espermatozoides PIAIA na palheta, maior a taxa de prenhez (R = 36,2; M = 50,0 e B = 64,7%). Thomé (2013) utilizou estas mesmas partidas de sêmen para IATF de outro grupo de vacas, sendo que a taxa de prenhez se comportou de forma semelhante, sendo de 27,79% para o grupo R (n = 55); 47,55% para o grupo M (n = 68) e de 60,32% para o grupo B (n = 60). Em ambos os estudos (Thomé, 2013; Oliveira et al., 2014) foram notadas diferenças ($P < 0,05$) somente entre os grupos B e R. Desta forma, estes resultados permitiram ponderar que o percentual de células PIAIA pode influenciar na fertilidade.

Se considerar os três grupos de partidas de sêmen dos trabalhos de Thomé (2013) e Oliveira et al. (2014), visto que foram realizados na mesma propriedade, com animais da mesma raça, idade, categoria e conduzidos pela mesma equipe na mesma estação de monta, temos como média da taxa de prenhez para o grupo R (8,5% PIAIA) 32%, para o grupo M (23% PIAIA) 48,77% e para o grupo B (44,5% PIAIA) 62,51% e a taxa de prenhez média das três partidas 47,75%. Se fosse excluída a partida de sêmen do grupo R da IATF, a taxa de prenhez média seria de 55,64%, ou seja, um incremento de 7,89% na taxa de prenhez. Se forem excluídas as partidas R e M, a média seria de 62,51% de prenhez, sendo o incremento na taxa de prenhez de 14,75% (Tabela 1).

Tabela 1 – Taxa de prenhez média (%) em função da porcentagem de espermatozoides apresentando integridade de membrana plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA) na palheta e o impacto no incremento da taxa de prenhez.

	Sêmen R (8,5% PIAIA)	Sêmen M (23% PIAIA)	Sêmen B (44,5% PIAIA)	Taxa de prenhez Total	Incremento na taxa de prenhez
Thomé (2013)	27,79 (n = 55)	47,55 (n = 68)	60,32 (n = 60)	45,22 (n = 183)	-
Oliveira et al. (2014)	36,20 (n = 58)	50,00 (n = 56)	64,70 (n = 68)	50,30 (n = 182)	-
Média	32,00 (n = 113)	48,78 (n = 124)	62,51 (n = 128)	47,76 (n = 365)	-
Excluindo sêmen R	-	48,78	62,51	55,64	7,88
Excluindo sêmen R e M	-	-	62,51	62,51	14,75

Atualmente, os centros de coleta e processamento de sêmen (CCPS) tem trabalhado em conjunto com os médicos veterinários de campo responsáveis pelas IAs e gerado uma grande base de dados, tornando possível a identificação de touros que apresentam diferentes potenciais de fertilidade, o que tem contribuído muito para separar touros com baixa, média e alta fertilidade de campo. No entanto, ao verificar os dados tabulados (Tabela 1) de um mesmo touro com partidas diferentes, nota-se que a fertilidade média deste touro é de 47,7%, mas se for dada atenção às partidas há uma grande oscilação (32-62,5% de prenhez), caso o potencial genético do touro se justifique, seria possível utilizar o sêmen deste indivíduo, excluindo-se somente partidas com baixo potencial de fertilidade.

Neste mesmo sentido, Vincent et al. (2012) avaliaram 660 partidas de sêmen provenientes de centrais de coleta e processamento de sêmen do Canadá e EUA, utilizando sistema computadorizado da motilidade espermática (CASA) e citometria de fluxo. Estas partidas foram previamente avaliadas pelas centrais por técnicas padrões. Notaram que houve 22,9% de discrepância entre as técnicas padrões e o uso de CASA e citometria de fluxo em rejeitar ou aprovar as partidas de sêmen. As partidas, aprovadas pela avaliação padrão e rejeitadas pela avaliação por CASA e citometria de fluxo, foram usadas para a IA, destas 56,4% apresentaram baixa fertilidade, 38,3% média e 5,3% alta fertilidade. Os autores concluíram que quanto mais análises forem realizadas, maior o controle de qualidade de uma partida de sêmen antes de se utilizar para IA.

Pensando na grande diversidade de touros e partidas utilizadas na IATF e nos diversos atributos espermáticos que podem influenciar, fica evidenciada a necessidade de ampliar os estudos. Assim, Santos (2016) realizou um experimento com o objetivo de identificar partidas de sêmen que apresentam falhas na fertilidade, mesmo sendo aprovadas pelas avaliações convencionais. Neste estudo foram realizadas análises convencionais (motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática) de 72 partidas de sêmen de 22 touros antes da estação de monta. Destas, 55 partidas de 18 touros foram aprovadas para o uso na IATF, mas somente 28 partidas de 10 touros foram utilizadas. As partidas de sêmen utilizadas na IATF foram submetidas a outras avaliações: análise computadorizada da motilidade espermática (CASA), integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial.

As taxas de prenhez das diferentes partidas de sêmen variaram de 71 a 37%, sendo que as partidas de sêmen foram classificadas e consideradas como de “Alta” fertilidade, quando a taxa de prenhez era $>50\%$ e de “Baixa” fertilidade quando a taxa de prenhez era $\leq 50\%$. Apesar de ser notada diferença na taxa de prenhez ($P < 0,01$), não foi notada diferença para motilidade, vigor, concentração, número de espermatozoides por palheta (NEP), número de espermatozoides móveis e normais por palheta, defeitos maiores, defeitos totais, integridade de membrana plasmática (MPI), alto potencial de membrana mitocondrial (AP), motilidade total (MT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade progressiva (VSL), velocidade de trajeto (VAP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e frequência de batimento (BCF). No entanto, foram encontradas diferenças entre os grupos (“Alta” e “Baixa”) para defeitos menores ($P = 0,05$), espermatozoides PIAIA/Palheta ($P = 0,01$), integridade de acrossomo (AI, $P = 0,03$), motilidade progressiva (MP, $P < 0,01$) e rápidos ($P < 0,01$), mas estas diferenças não explicariam a oscilação da fertilidade (Santos, 2016).

Buscando outras formas de avaliar os resultados e confrontá-los com as avaliações laboratoriais, Santos (2016) separou as partidas de sêmen por quartis superior e inferior de acordo com cada característica espermática. Esta separação resultou em diferenças para concentração espermática, NEP, número de espermatozoides móveis por palheta, espermatozoides móveis e normais, defeitos maiores, defeitos menores, defeitos totais, MPI, AI, AP, PIAIA, PIAIA/palheta, mas esta divisão de grupos por quartis superior e inferior para estas características não refletiram em diferença sobre a fertilidade ($P > 0,05$). Entretanto, para MT ($P < 0,01$) e MP ($P < 0,01$) além da diferença entre os quartis foi notado efeito da fertilidade (MT, $P = 0,05$ e MP, $P = 0,01$), sendo maior para os de baixa fertilidade (MT = $72,18 \pm 0,76\%$; MP = $50,45 \pm 1,44\%$) do que para o de alta fertilidade (MT = $56,95 \pm 6,54\%$; MP = $34,85 \pm 0,85\%$). O autor concluiu que os padrões de qualidade de partidas de sêmen que apresentam fertilidade distinta podem ser semelhantes nas características avaliadas, além disso, que pode haver diferença na qualidade espermática entre as partidas que não influenciam a fertilidade. Desta forma, são necessárias outras análises mais acuradas para investigar as causas de falha na fertilidade de algumas partidas de sêmen.

Pensando nestes resultados, Florez-Rodriguez (2017) submeteu as mesmas partidas de sêmen utilizadas por Santos (2016) a outras avaliações utilizando o sistema de citometria de fluxo. Foram avaliadas membranas plasmática e acrossomal (SYTO-59[®], PI e Lectina obtida de *Arachis hypogea* conjugada com isotiocionato de fluoresceína, FITC-PNA), potencial de membrana mitocondrial (JC-1 e PI), produção de ânion superóxido pela mitocôndria espermática (kit MitoSox red[®]), produção de ânion superóxido citoplasmático (Dihydroethidium[®], DHE associado ao YOPRO e PI), peroxidação lipídica (C11-BODIPY^{581/591} adicionados H342 e PI) e metabolismo espermático (resazurina, YOPRO e SYTOX Green), foram ainda detectados peroxinitrito (Dihidrorodamina[®], DHR, SYTO-59[®] e PI) e óxido nítrico (4,5-diaminofluoresceína-2/diacetate, DAFi-2/DA associada ao PI e SYTO 59[®]). Verificou-se que alguns marcadores mitocondriais podem ser importantes na identificação de partidas com baixo potencial de fertilidade. Encontrou que o óxido nítrico foi mais alto ($P < 0,05$) para o sêmen de alta fertilidade ($5230,5 \pm 434,56$) do que para o de baixa fertilidade ($3480,28 \pm 434,56$). Além disso, nas avaliações de motilidade pelo CASA, notou-se que VCL, VAP e ALH foram mais altos ($P < 0,05$) para o sêmen de baixa fertilidade do que para o de alta. Estas alterações no padrão de movimento espermático podem indicar o início da capacitação espermática precoce, o que não seria desejado.

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



já foram relatadas subpopulações em relação às características de cinética celular (Muiño et al., 2008; 2009). Existem subpopulações espermáticas agrupadas pela integridade de membranas e potencial mitocondrial determinadas pelo uso de sondas fluorescentes (Celeghini et al., 2007). Igualmente, tem-se evidenciado na análise morfométrica a presença de subpopulações espermáticas distribuídas de acordo com a dimensão e formato da cabeça (Rubio-Guillén et al., 2007; Valverde et al., 2016). Desta forma, quando o estudo da fertilidade em relação às características espermáticas tem como base a média dos valores e considera o ejaculado como uma amostra homogênea perde-se a capacidade de predição (Yániz et al., 2015). Segundo as pesquisas recentes, a heterogeneidade das subpopulações espermáticas tem relevância funcional, principalmente com relação à fertilidade (Yániz et al., 2016).

Além das técnicas apontadas, muitas outras vêm sendo desenvolvidas e empregadas para se avaliar diferentes estruturas espermáticas, tais como para avaliar o DNA espermático (Florez-Rodriguez et al., 2014), a produção de espécies reativas de oxigênio (Alves et al., 2015), o perfil dos microRNAs presentes no sêmen (Govindaraju et al., 2015) e muitas outras.

Embora o desenvolvimento de técnicas e equipamentos tenham tornado possível identificar com mais acurácia estruturas e funções espermáticas (Florez-Rodriguez, 2017), ainda é atual afirmar que o método de predição da fertilidade de uma amostra seminal *in vitro* não é simples (Amann, 1989), considerando fatores dependentes do indivíduo, do próprio espermatozoide, de como o sêmen foi processado e de como a amostra foi avaliada (Amann; Hammerstedt, 1993; Vincent et al., 2012). Estas estimativas ou predições do potencial de fertilidade do sêmen tem sido difíceis, principalmente pela heterogeneidade do ejaculado, devido à presença de distintas subpopulações com diferentes características funcionais dentro do ejaculado, que podem contribuir no processo de fecundação (Rodríguez-Martínez, 2006).

Contudo, as causas da falha na fertilidade de partidas de sêmen bovino estão sendo buscadas por muitos pesquisadores do mundo; entretanto, seus resultados são divergentes quando as características espermáticas são consideradas isoladamente. Em adição, concordam que quanto mais características espermáticas são avaliadas numa partida de sêmen, a acurácia em identificar partidas com possível redução no potencial de fertilidade aumenta. Desta forma, a aplicação de técnicas adicionais para avaliar partidas de sêmen, antes de serem comercializadas, contribui para melhorar o controle de qualidade e reduz o impacto sobre a fertilidade e produtividade do rebanho.

Referências

- Alves MBR, de Andrade AFC, Arruda RP, Batissaco L, Florez-Rodriguez SA, Lançoni R, Oliveira BMM, Torres MA, Ravagnani GM, Almeida TG, Vellone VS, Celeghini ECC. An efficient technique to detect sperm reactive oxygen species: the Cell Rox Deep Red[®] fluorescent probe. *Biochem Physiol*, v.4, p.1-5, 2015.
- Amann RP. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?. *J Androl*, v.10, p.89-98, 1989.
- Amann RP, Hammerstedt RH. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl*, v.14, p.397-406, 1993.
- Anuário estatístico da pecuária de corte (ANUALPEC). São Paulo: FNP Consultoria e Comércio Ltda., 2015.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, NASCIMENTO J, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaimes JD. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.145-151, 2011.
- Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA). Relatório Anual, São Paulo: ASBIA, 2014.
- Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA). Exportações de sêmen bovino devem dobrar nos próximos anos. 2017. Disponível em: < <http://www.asbia.org.br/novo/imprensa/> > acessado em 27/02/2017.
- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci*, v.82/83, p.479-486, 2004.
- Braundmeier AG, Miller DJ. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *J Dairy Sci*, v.84, p.1915-1925, 2001.
- Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.479-488, 2007.
- Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.119-131, 2008.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- Curtis GG, Vishwanath R, Pitt C, Garner DL, Casey PJ. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J Androl*, v.19, n.6, p.704-709, 1998.
- Florez-Rodriguez SA. Importância da qualidade espermática sobre a predição do potencial de fertilidade *in vivo* em bovinos: contribuição da mitocôndria e das subpopulações espermáticas. 2017. 157f. Tese



- (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017.
- Florez-Rodriguez SA, Arruda RP, Bianchi-Alves MR, Affonso FJ, Carvalho HF, Lemes KM, Lançoni R, DE Andrade AFC, Celeghini ECC.** Morphofunctional characterization of cooled sperm with different extenders to use in equine-assisted reproduction. *J Equine Vet Sci*, v.34, p.911-917, 2014.
- Forero-Gonzalez RA, Celeghini ECC, Raphael CF, Andrade AFC, Bressan FF, Arruda RP.** Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia (Berlin)*, v.44, p.154-159, 2012.
- Fuerst-Waltl B, Schwarzenbacher H, Perner C, Solkner J.** Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Anim Reprod Sci*, v.95, p.27-37, 2006.
- García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Ramón M, Del Olmo E, Jiménez-Rabadán P, Fernández-Santos MR, Anel-López L, Garde JJ, Soler AJ.** Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support in vitro capacitation and fertilisation. *Reprod Fertil Dev*, v.26, p.725-732, 2014.
- Govindaraju A, Uzun A, Robertson L, Atli MO, Kaya A, Topper E, Crate EA, Padbury J, Perkins A, Memili E.** Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol*, v.10, p.1-10, 2012.
- Hammersted RH, Graham JK, Nolan JP.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, v.11, p.73-88, 1990.
- Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H.** Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from swedish AI bulls. *Theriogenology*, v. 55, p.947-981, 2001.
- Larsson B, Rodríguez-Martínez H.** Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Animal Reproduction Science*, v. 60/61, p. 327-336, 2000.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveria ATD, Rodrigues JL.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, p.327-44, 2002.
- Muñoz R, Peña AI, Rodríguez A, Tamargo C, Hidalgo CO.** Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology*, v.72, p.860-868, 2009.
- Muñoz R, Tamargo C, Hidalgo CO, Peña AI.** Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Anim Reprod Sci*, v.109, p.27-39, 2008.
- Oliveira BMM, Arruda RP, Thomé HE, Maturana Filho M, Oliveira GC, Guimarães CF, Nichi M, Silva LA, Celeghini ECC.** Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. *Theriogenology*, v.82, p.767-772, 2014.
- Ôura C, Toshimori K.** Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. *Int Rev Cytol*, v.122, p.105-151, 1990.
- Rodríguez-Martínez H.** Can we increase the estimative value of semen assessment? *Reprod Dom Anim*, v.41(Suppl.2), p.2-10, 2006.
- Rubio-Guillén J, González D, Garde J, Estes M, Fernández-Santos M, Rodríguez-Gil J, Madrid-Bury N, Quintero-Moreno A.** Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod Dom Anim*, v.42, p.354-357, 2007.
- Sá Filho MF, Crespilho AM, Santos JEP, Perry GA, Baruselli PS.** Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin- based protocols sukled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci*, v.120, p.23-30, 2010.
- Santos FB.** Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em vacas de corte. 2016. 62f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- Thomas CA, Garner DL, Dejarnette JM, Marshall CE.** Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod*, v.58, p.786-793, 1998.
- Thomé HE.** Resposta inflamatória uterina em bovinos após inseminação artificial com sêmen avaliado por associações de sondas fluorescentes: efeitos sobre a fertilidade. 2013. 113f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- Valverde A, Arenán H, Sancho M, Contell J, Yániz J, Fernández A, Soler C.** Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws. *Asian J Androl*, v.18, p.851-857, 2016.
- Vincent P, Underwood SL, Dolbec C, Bouchard N, Kroetsch T, Blondin P.** Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Anim Reprod*, v.9, p.153-165, 2012.
- Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Sánchez-Nadal JA, Santolaria P.** Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Anim Reprod Sci*, v.156, p.128-134, 2015.
- Yániz J, Vicente-Fiel S, Soler C, Recreo P, Carretero T, Bono A, Berné J, Santolaria P.** Comparison of different statistical approaches to evaluate morphometric sperm subpopulations in man. *Asian J Androl*, v.18, p.819-823, 2016.