FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E MEIO AMBIENTE – PGDRA

GRAU DE HIPERATIVAÇÃO ESPERMÁTICA E CIO NA PRENHEZ DE VACAS DE CORTE INSEMINADAS EM TEMPO FIXO

George Moreira da Silva

PORTO VELHO-RO
2021

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E MEIO AMBIENTE – PGDRA

GRAU DE HIPERATIVAÇÃO ESPERMÁTICA E CIO NA PRENHEZ DE VACAS DE CORTE INSEMINADAS EM TEMPO FIXO

George Moreira da Silva

Orientador: Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer

Dissertação de mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Área de Concentração em Biologia da Reprodução, para obtenção do Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente

PORTO VELHO-RO
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Fundação Universidade Federal de Rondônia

Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

S586g Silva, George.

Grau de hiperativação espermática e cio na prenhez de vacas de corte inseminadas em tempo fixo / George Silva. -- Porto Velho, RO, 2021.

46 f. : il.

Orientador(a): Prof. PhD Luiz Francisco Machado Pfeifer

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Fundação Universidade Federal de Rondônia

1.Detecção de cio. 2.cinética espermática. 3.momento da ovulação. I. Pfeifer, Luiz Francisco Machado. II. Título.

CDU 636.082.45

Bibliotecário(a) Luã Silva Mendonça CRB 11/905

GEORGE MOREIRA DA SILVA

GRAU DE HIPERATIVAÇÃO ESPERMÁTICA E CIO NA PRENHEZ DE VACAS DE CORTE INSEMINADAS EM TEMPO FIXO

Comissão Examinadora

Documento assinado eletronicamente por **LUIZ FRANCISCO MACHADO PFEIFER**, **Presidente**, em 27/05/2021, às 09:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **ERIKLIS NOGUEIRA**, **Examinador Externo**, em 28/05/2021, às 09:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **ELIZÂNGELA MÍRIAN MOREIRA**, **Examinadora Externa**, em 26/05/2021, às 18:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **GEORGE MOREIRA DA SILVA**, **Discente**, em 27/05/2021, às 09:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Porto Velho, 26 de maio de 2021.

Resultado: Aprovada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me proporcionar força, perseverança e sabedoria durante esta etapa da minha vida.

Sou grato à minha família pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida.

À minha namorada Amanda Rezende pela compreensão e paciência demonstrada durante o período do projeto.

Deixo um agradecimento especial ao meu orientador Luiz Francisco Machado Pfeifer pela paciência, orientação e conhecimentos transmitidos durante a realização do estágio.

Aos meus amigos do Núcleo de Reprodução Animal: Vanessa Lemos, Vanessa Rachele, Paulo Marcos, Jéssica, Elizângela, Renata, Danilo, Jair Sábio, Ingrid, Felipe, Samira, Gaby e todos com quem tive a oportunidade de conviver e crescer ao longo desse mestrado; e também aos funcionários do campo experimental da Embrapa, Ricardo, Marcelo, Del e Adalto, por colaborarem na execução dos experimentos;

Agradeço a empresa Seleon Biotecnologia por fornecer amostras de sêmen utilizadas nesse experimento e por compartilhar os dados das amostras de sêmen submetidas à análise de sêmen assistida por computador.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pelo apoio financeiro que permitiu a realização do mestrado.

A todos aqueles que não mencionei, mas

de alguma forma me ajudaram durante esse período, a minha sincera gratidão!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Design experimental do experimento 1 de vacas lactantes submetidas ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF).....29

Figura 2: Taxa de prenhez do experimento 2 de vacas de corte inseminadas com sêmen (H+ ou H-) em relação aos animais que expressaram cio ou não até o momento da IATF; Letras diferentes indicam efeito entre os grupos (P <0.05).....30

Figura 3: Probabilidade de prenhez de acordo com o diâmetro do folículo dominante (P=0.04) 31

Figura 4: Probabilidade de cio de acordo com o diâmetro do folículo dominante (P=0.01) 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Respostas ovarianas de vacas Nelore que expressaram cio antes e após 48 horas a partir da remoção do implante.....29

Tabela 2: Análise do sêmen de acordo com os parâmetros da cinética espermática (CASA)....30

Tabela 2. Taxa de prenhez e diâmetro do folículo pré ovulatório de acordo com a expressão de cio e o grau de hiperativação espermática.....33

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça

BCF - Frequência cruzada de batimento flagelar

BE – Benzoato de Estradiol

CASA - Análise de sêmen assistida por computador

eCG – Gonadotrofina Coriônica equina

ECP – Cipionato de estradiol

IA – Inseminação artificial

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo

LIN – Linearidade

P4 – Progesterona

PGF – Prostaglandina

POF- Folículo pré-ovulatório

PIB – Produto Interno Bruto

STR – Retilinearidade

VAP – Velocidade média do caminho

VCL – Velocidade curvilínea

VSL – Velocidade em linha reta

WOB – Coeficiente de oscilação

RESUMO

Para a elaboração da dissertação de mestrado foram realizados dois experimentos que estão descritos em forma de artigo científico. 1) Experimento: o objetivo foi determinar o momento da ovulação dos animais que expressaram cio ou não até o momento da IATF. A hipótese testada foi que vacas que expressam cio até 48h após a remoção do implante de P4 ovulam mais cedo. Neste estudo, 24 vacas primíparas da raça Nelore foram submetidas a um protocolo IATF (2 mg BE + CIDR no D0 / 150 μg d-Cloprostenol + 300 UI eCG + 1 mg ECP + Estrotect® – CIDR no D8 / IATF 48h). Os animais foram categorizados em dois grupos de acordo com a expressão de cio (Cio e SCio) em até 48 horas após a remoção da P4. Foram realizadas avaliações ultrassonográficas para detectar o momento da ovulação e diagnóstico de gestação (DG) 35 dias após a IATF. Posteriormente, 12 vacas que foram diagnosticadas como não prenhes foram ressincronizadas, totalizando 36 IAs (Cio: 19; SCio: 17). Os resultados do experimento 1 demostraram que os animais do grupo Cio ovularam mais cedo (P<0,02) em relação ao SCio (73,3±13,1 vs. 95,5±37,5h). 2) Experimento: O objetivo foi avaliar o efeito do sêmen hiperativo na fertilidade de vacas de corte que expressam cio ou não até o momento da IATF. A hipótese testada foi que o grau de hiperativação espermática afeta a fertilidade de vacas que apresentaram cio ou não até o momento da IATF. Neste experimento, 473 vacas multíparas da raça Nelore foram submetidas ao mesmo protocolo descrito no Experimento 1. Todos os animais foram pintados com bastão marcador na região lombo-sacral para identificação do cio. Na IA utilizou-se 2 partidas de sêmen de 3 touros diferentes, previamente analisado pelo CASA, e as seguintes variáveis foram avaliadas para determinar o grau de hiperativação (adaptado de Pfeifer et al. 2019): velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e linearidade (LIN). Foram consideradas hiperativo (H+; LIN < 51,3%, ALH > 7,5 μm and VCL > 164 μm/s), e não hiperativado (H-; LIN > 54,8%, ALH < 6,1 μm and VCL < 139 μm/s). No momento da IA, as vacas foram distribuídas em quatro grupos de acordo com a expressão de cio (Cio e SCio) e o grau de hiperatividade espermática (H- e H+): CioH+, CioH-, SCioH+ e SCioH-. O DG foi realizado 30 dias após a IATF por ultrassonografia. Não houve efeito (P=0,10) do grau de hiperativação espermática na taxa de P/IA. Entretanto, os grupos CioH+ (60,3%, 88/146) e CioH- (66,9%, 99/148) tiveram maior taxa de P/IA (P < 0,02) em relação aos grupos SCioH+ (49,1%, 55/112) e SCioH- (47,8%, 33/69). Os resultados deste estudo demostraram que vacas que expressam cio em até 48h após a remoção da P4 ovulam mais cedo e tem maior chance de concepção na IATF. Entretanto, o grau de hiperativação espermática não afetou a fertilidade de vacas de corte que expressaram cio ou não no momento da IATF.

Palavras-chaves: Detecção de cio; cinética espermática; momento da ovulação.

ABSTRACT

For the preparation of the master's dissertation, two experiments were carried out, which are arranged in the form of a scientific article. 1) Experiment: the objective was to determine the moment of ovulation of the animals that expressed estrus or not until the moment of the TAI. The hypothesis tested was that cows express estrus to 48h after removal of the P4 implant ovulate earlier. In this study, 24 Nelore cows were subjected to an estradiol-progesterone based TAI protocol (2 mg BE + CIDR at D0 / 150 µg d-Cloprostenol at D8 + 300 IU eCG + 1 mg ECP + Estrotect®) - CIDR at D8 / TAI 48h). The animals were categorized into two groups according to the expression of estrus (E: Estrus; and NE: No estrus) at 48 hours after P4 removal. Ultrasound evaluations were performed to detect the moment of ovulation and pregnancy status 35 days after TAI. Subsequently, 12 cows that were diagnosed as not pregnant were resynchronized, totaling 36 IAs (Estrus: 19; No estrus: 17). The results of experiment 1 demonstrated that animals in estrus group ovulated earlier ($P < 0.02$) in relation to the no estrus (73.3 ± 13.1 vs. 95.5 ± 37.5h). 2) Experiment: The objective was to evaluate the effect of hyperactive semen on the fertility of beef cows that express estrus or not until the moment of the TAI. The hypothesis tested was that the degree of sperm hyperactivation affects the fertility of cows that expressed estrus or not until the time of the IATF. In this experiment, 473 multiparous Nellore cows were subjected to the same protocol described in Experiment 1. All animals were painted with a marker stick in the lumbosacral region to identify estrus. In AI, 2 semen matches from 3 different bulls were used, previously analyzed by CASA, and the following variables were evaluated to determine the degree of hyperactivation (adapted from Pfeifer et al. 2019): curvilinear velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), and linearity (LIN). They were considered hyperactive (H+; LIN < 51.3%, ALH > 7.5 µm and VCL > 164 µm/s), and not hyperactive (H-; LIN > 54.8%, ALH < 6.1 µm and VCL < 139 µm/s). At the time of AI, cows were divided into four groups according to the expression of heat (Estrus and No Estrus) and the degree of sperm hyperactivity (H- and H +): EH+ (n=144), EH- (n=148), NEH+ (n=112), and NEH- (n=69). Pregnancy status was performed 30 days after IATF by ultrasound. There was no effect ($P = 0.10$) of the degree of sperm hyperactivation on the P/AI rate. However, the EH+ (60.3%, 88/146) and EH- (66.9%, 99/148) groups had a higher P/AI rate ($P < 0.02$) compared to the NEH+ groups (49,1%, 55/112) and NEH- (47.8%, 33/69). The results of this study showed that cows that express estrus within 48 hours after P4 removal ovulate earlier and are more likely to conceive at IATF. However, the degree of sperm hyperactivation did not affect the fertility of beef cows that expressed estrus or not at the time of TAI.
Keywords: estrus detection; sperm kinematics; moment of ovulation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO *10*
2. OBJETIVO *13*
2.1 Geral **13**
2.2 Específico **13**
3. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO *14*
3.1 Protocolo de sincronização **14**
3.3 Fisiologia do Cio **15**
3.2 A importância do cio no momento da IATF **16**
3.3 Análise espermática assistida por computador (CASA) **19**
3.4 Motilidade espermática **20**
3.5 Subpopulações de espermatozoide **21**
4. ARTIGO *23*
INTRODUÇÃO **24**
MATERIAL E MÉTODOS **26**
RESULTADOS *29*
DISCUSSÃO **34**
REFERÊNCIAS *36*

1. INTRODUÇÃO

No ano de 2018, o Brasil manteve-se como o detentor do maior rebanho comercial de bovino do mundo, com 221,81 milhões de cabeças. No mesmo período, o Produto Interno Bruto (PIB) da pecuária somou R$ 597,22 bilhões, 8,3% acima dos R$ 551,41 bilhões apurados no ano de 2017. Com isso, o PIB da pecuária elevou para 8,7% sua participação no PIB total brasileiro. Esses números, é resultante do aumento no número de abates que chegou a 44,23 milhões de cabeças, com produção estimada de 10,96 milhões de toneladas equivalente carcaça (TEC) e, representando 12,8% da produção mundial de carne. Desse total, 20,1% da carne foi exportada e 79,6% foi destinada ao mercado interno, responsável por um consumo per capita de 42,12kg/ano (ABIEC, 2019).

No estado de Rondônia, a criação de bovinos cresceu 26,02% nos últimos dez anos e, atualmente, o estado possui o sexto maior rebanho do Brasil e uma participação de 6,46% do rebanho nacional. De acordo com os dados publicados na última campanha de vacinação contra febre aftosa, o estado de Rondônia possuí 14.344.017 milhões de cabeças, sendo que 73,3% (10.951.759 milhões de cabeças) são bovinos corte e 26,7% (3.385.398 milhões de cabeças) são bovinos de aptidão leiteira (IDARON, 2018). A pecuária de corte é uma das principais atividades econômicas do estado, em 2018, Rondônia abateu 2.390.123 de cabeças e as exportações de carne bovina geraram receitas de US$ 587,7 milhões, vendendo o seu produto para 39 países (MAPA, 2019). Na pecuária Leiteira, o estado de Rondônia ocupa a sétima posição ranking da bacia leiteira do país e a primeira da região 6,46% do rebanho nacional. Com produção estimada em 972 milhões de litros em 2018, equivalente a 2,8 % da produção nacional e a 47,7% do volume da região norte (ANUÁRIO DO LEITE, 2018; ABIEC, 2018; IBGE, 2019).

Apesar do maior rebanho comercial de bovinos, a pecuária brasileira apresenta-se com baixa eficiência produtiva. De acordo com os dados publicado pela ABIEC (2019), o Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial de produção de carne com 15,3% da carne mundial, que atualmente, é liderado pelos Estados Unidos que produzem 17,2% da carne mundial. Desta forma, torna-se imprescindível o aprimoramento e desenvolvimento de novas tecnologias que contribuem para o aumento da produtividade na pecuária, otimizando os sistemas de rentabilidade dos rebanhos. Entre as tecnologias desenvolvidas, as biotecnologias da reprodução merecem destaque (BARUSELLI, 2019).

A inseminação artificial (IA) é uma das principais técnicas utilizadas mundialmente para disseminar a genética desejável entre rebanhos bovinos (BÓ et al., 2007) e, que ganhou maior difusão a partir do desenvolvimento de protocolos de inseminação artificial em tempo

fixo (IATF) que contribuiu para o uso generalizado da técnica de IA (PFEIFER *et al.*, 2015). Embora os protocolos hormonais para sincronização do ciclo estral sejam realidade comercial há mais de 30 anos, os produtores de carne têm sido lentos em adotar essa prática de manejo. O Brasil possui 72,5 milhões de fêmeas bovinas em idade reprodutiva, entretanto, apenas 13,1% são inseminadas artificialmente, sendo 86,3% das inseminações realizadas em tempo fixo (13,3 milhões de IATF). Das fêmeas inseminadas por IATF, estima-se que 10,2 milhões (77,6%) são fêmeas de corte e 3,1 milhões (22,4%) são fêmeas de aptidão leiteira (BARUSELLI, 2019; ANUALPEC, 2018).

De acordo com o levantamento realizado pelo Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ / USP) que elabora um estudo da expansão da IATF no Brasil através dos dados publicados pela ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial; Index ASBIA; representa 90% do mercado nacional de sêmen; com ajuste para 100%), em 2018 o mercado nacional da IA comercializou aproximadamente 15,4 milhões de doses de sêmen, um crescimento de 220% comparado ao início do levantamento (2002). Ainda, em comparação com o ano anterior (2017), a comercialização de sêmen cresceu 13,7%. A partir dos dados coletados nos últimos 16 anos, observou-se um crescimento de 130 vezes na utilização da IATF. Somente em 2018, o número de protocolos comercializados, alcançou 13,3 milhões de procedimentos, representando 86% das inseminações realizadas por IATF no Brasil. Em 2018, também houve um crescimento representativo do mercado sêmen, que registrou um aumento de 16,1 % quando comparado a 2017, com 11,4 milhões de IATF (ASBIA, 2019; BARUSELLI, 2019).

De acordo com os dados publicado pelo IDARON em 2019, Rondônia possui 5.697.405 fêmeas bovinas em idade reprodutiva e, segundo os dados do ASBIA (2019) apenas 7,6% deste rebanho são submetidas a inseminação artificial, de modo que, 95,9% são vacas de corte e 4,1% são fêmeas de aptidão leiteira. Atualmente, a situação econômica do mundo requer práticas de gerenciamento eficientes para aumentar a produtividade e rentabilidade. Uma boa eficiência reprodutiva é fundamental para aumentar a lucratividade. O uso de biotecnologias se tornou de grande importância, principalmente em áreas tropicais e subtropicais, onde a IA é a única alternativa para introduzir uma melhor genética em um determinado rebanho. No entanto, a variabilidade em resposta aos tratamentos hormonais, tempo e número de manejo necessários para realizar tratamentos, detecção de cio, principalmente em bovinos *B. indicus*, limitam a ampla aplicação e o sucesso destas biotecnologias (BÓ et al., 2003). Além disso, nas ultimas décadas a taxa de prenhez geral para IATF em bovinos de corte brasileiros tem se mantido em torno dos 50%, sendo assim, é fundamentar buscar técnicas que visam aumentar essa taxa.

Ainda que os protocolos de IATF convencionalmente utilizados em fazendas de corte demonstrem bons resultadas na taxa de P/IA, novos estudos vêm sendo conduzidos para avaliar os fatores que afetam a fertilidade desses protocolos. O sucesso da prenhez é influenciada pelo diâmetro do folículo FPO e pelo aumento das concentrações pré-ovulatórias de estradiol (PERRY et al., 2014), além disso, o estradiol ovariano desempenha um papel importante no estabelecimento do momento da receptividade uterina (OZTURK & DEMIR, 2010). Vacas que expressam cio apresentam uma correlação positiva entre o diâmetro do folículo e o pico de concentração de estradiol (PERRY et al., 2014). E essas concentrações aumentadas de estradiol desempenham um papel crítico no processo de fertilização, uma vez que, o trato genital apresenta um aumento na produção de muco mais fluido e com baixa viscosidade e esta características de muco favorece o deslocamento do espermatozoide no trato reprodutivo da vaca até o local de fertilização (ROELOFS et al., 2010; RUTLLANT et al., 2005).

Para melhores resultados, os estudos devem ser conduzidos levando em consideração os eventos que afetam a fertilidade do macho e da fêmea. Entre os fatores estudados, poucos estudos avaliaram a cinética do sêmen utilizado na IA. Vários pesquisadores já relataram que touros diferem entre si na capacidade de fecundar oócitos e no desenvolvimento de blastocistos após o procedimento de fertilização in vitro (SUDANO, et al., 2011). Além disso, há uma variabilidade marcante desses touros na fertilidade a campo (CORREA, et al., 1997; WARD et al., 2001; ANDERSSON et al., 2004). Em estudos recentes, a equipe do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Rondônia avaliou o efeito da fertilidade de acordo com a resposta ovariana e cinética espermática. Nesse estudo, foram usadas partidas de sêmen (sêmen hiperativo vs. Não hiperativado) que apresentavam características de motilidade diferentes em associação com as respostas ovarianas no dia da IATF, de modo que, o diâmetro do FPO foi mensurado por meio da ultrassonografia para indicar o momento da ovulação, ou seja, vacas que apresentavam folículos menores (<13mm) tinham ovulação tardia e folículos maiores (>13mm) tinham ovulação precoce. Através desse estudo, verificou-se que vacas inseminadas com sêmen não hiperativado não apresentaram diferença na P/IA ($P > 0.2$), entretanto, vacas inseminadas com partidas de sêmen hiperativado tinham uma menor probabilidade de emprenharem quando apresentavam diâmetros de FPO menores (PFEIFER et al, 2019). A partir dos resultados deste estudo, novas estratégias podem ser abordadas utilizando o grau de hiperativação espermática e expressão de cio. Como a metodologia adotada no estudo de Pfeifer (2019) exige a ultrassonografia, tornando o emprego desta técnica de difícil acesso para os pequenos produtores, o presente estudo, busca uma nova metodologia para substituir a ultrassonografia na identificação de animais com ovulações precoces e tardias.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

O objetivo deste estudo foi associar o efeito do grau de hiperativação espermática e da expressão de cio na fertilidade de vacas de corte inseminadas em tempo fixo.

2.2 Específico

1. Determinar o momento da ovulação dos animais que expressaram cio ou não em até 48h após a remoção da progesterona (P4) exógena.
2. Determinar o efeito do grau de hiperativação na taxa de prenhez de vacas que expressam cio ou não em até 48h após a remoção da P4 exógena.

3. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

3.1 Protocolo de sincronização

O desenvolvimento dos protocolos de IATF foi um grande avanço no manejo reprodutivo de bovinos leiteiros e de corte, pois dispensou a necessidade da detecção de cio para a IA. Assim, esses programas para sincronização do ciclo estral têm sido utilizados para o gerenciamento reprodutivo em muitos países. Esses programas envolvem uma série de tratamentos hormonais projetados para sincronizar uma onda folicular, sincronizar a função do corpo lúteo (CL) e, finalmente, sincronizar a ovulação, permitindo IA sem a necessidade de detecção de cio (PURSLEY et al., 1997). No Brasil, os protocolos de sincronização baseados em estradiol e progesterona têm sido usados com sucesso para controlar a dinâmica folicular e luteal e para sincronizar a ovulação, permitindo a IA sem a detecção do cio (SÁ FILHO et al., 2011).

Nestes protocolos convencionais de sincronização, os animais recebem no dia 0 (D0) do protocolo, um dispositivo intravaginal de progesterona (P4), além da administração de um éster de estradiol (Benzoato de estradiol ou Valerato de estradiol para sincronizar o surgimento de uma nova onda folicular). E esse implante é removido no dia 8 (D8) ou 9 (D9). Para garantir a luteólise, a PGF 2α é administrada um dia antes da retirada do implante ou no momento da remoção do dispositivo de P4. No momento da remoção do dispositivo de P4, os animais recebem uma dose de eCG (como suporte à gonadotrofina endógena) e uma dose baixa de estradiol, concomitante à remoção do dispositivo ou 24 h depois (para induzir a ovulação sincronizada). A utilização do eCG na remoção do dispositivo tem importância específica em *Bos indicus* com cria ao pé; gerando um aumento na taxa de crescimento do folículo dominante desde a remoção do implante até a IATF, no diâmetro do folículo dominante e nas taxas de ovulação e prenhez em vacas com anestro pós-parto (BARUSELLI et al., 2004; BO et al., 2007; SÁ FILHO et al., 2009). Este protocolo comumente utilizado no Brasil tem demostrado ser eficiente na sincronização de uma nova onda folicular. Salles et al. (2012) avaliou a eficiência desse protocolo e relatou que > 80% dos animais responderam a este protocolo e, apenas 6,7% não apresentavam um folículo dominante na remoção do dispositivo P4. Comumente, os resultados na taxa de prenhez/IA apresentada por esses protocolos a base de estradiol e progesterona encontra-se médias aceitáveis, com média geral de 50% (MENEGHETTI et al., 2009; SA FILHO et al., 2009).

3.3 Fisiologia do Cio

A expressão de cio ocorre devido a uma influência específica dos hormônios esteroides ovarianos nos centros comportamentais no cérebro dos mamíferos. Os folículos amadurecem sob a estimulação de hormônios gonadotróficos hipofisários durante os últimos três ou quatro dias do ciclo estral e, sintetizam e secretam quantidades crescentes de estradiol. Em um momento, essas concentrações circulantes de estradiol sistêmico atinge um limiar, que dispara dois eventos intimamente ligados a um feedback positivo em áreas específicas do cérebro. Primeiro, a concentração limiar do estradiol causa a resposta comportamental, denominada cio e uma segunda e intima influência no feedback positivo do estradiol para desencadear uma onda de liberação de hormônios gonadotróficos hipofisários, especialmente o LH, que resulta em um pico de gonadotrofinas, detectável na circulação periférica que estimula o processo de ovulação em um tempo relacionado (ROELOFS et al., 2010; HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Durante o cio, o estradiol exerce uma importante influência no trato genital da vaca, tornando-o edematoso, tônico e altamente secretor, especialmente nas glândulas cervicais, levando a um aumento na produção de muco. Em espécies nas quais o sêmen é depositado na vagina no momento do acasalamento, como nos ruminantes, o colo do útero e seu complemento de muco desempenham um papel crítico na reprodução. Esse fluido é a primeira barreira fisiológica que os espermatozoides encontram no trato reprodutivo feminino (ROELOFS et al., 2010). Assim, durante o cio este muco cervical se torna mais abundante, aquoso, translúcido e menos viscoso, facilitando assim o deslocamento do espermatozoide até o local de fertilização. Em contraste, na fase lútea do ciclo, esse muco torna-se escasso e viscoso e, consequentemente, desfavorável ao deslocamento do espermatozoide no trato reprodutivo feminino (RUTLLANT et al., 2005).

3.2. Comportamento do cio

Em bovinos, o cio é uma manifestação externa e visível do comportamento e uma estratégia para garantir que a fêmea acasale próximo à época da ovulação. Durante o cio, o comportamento de uma vaca muda devido às mudanças hormonais que precedem a ovulação. Diferentes sinais comportamentais podem ser observados, durante cio, por exemplo, cheirar a vagina de outra vaca, apoiar o queixo em outra vaca ou aceitar a monta de outros animais. De modo que, a aceitação da monta é o principal indicador que a vaca realmente está no cio (ROELOFS et al., 2005, 2010).

3.2 A importância do cio no momento da IATF

O desenvolvimento de protocolos de IATF eliminaram a necessidade de detecção de cio e beneficiou em muito as operações em que o trabalho era limitado pela detecção de cio, aumentando assim, o número de vacas inseminadas artificialmente. Embora os protocolos dispensaram a necessidade de detecção de cio para a IA, a expressão de cio antes da inseminação aumenta a confiança de que a fêmea respondeu corretamente ao protocolo (RICHARDSON et al., 2016). Antes dos protocolos hormonais, a eficiência da IA em bovinos de corte estava intimamente relacionada ao sucesso da detecção de cio, de modo que, o momento recomendado para a IA era 12 horas após a observação do cio ou a "regra da manhã e tarde" (TRIMBERGER & DAVIS, 1943). Esse método exigia a observação visual intensa dos animais e dois manejos ao dia para a inseminação, além de que, era frequentemente observada baixas taxas de concepção em bovinos de corte após IA em decorrência por erros na detecção do cio, visto que, esses animais têm um período curto de cio e apresentava uma tendência em expressar o cio no período da noturno, afetando assim, a eficiência dos programas de IA que requeriam a detecção de cio (BÓ et al., 2003; ROELOFS, 2006).

Estudos que avaliaram o efeito do cio na IATF, relataram que a expressão do cio próximo a IATF está associada a maior fertilidade (SA FILHO et al., 2011; GENTRY et al., 2016; RICHARDSON et al., 2016). A falha na expressão comportamental do cio após a remoção do dispositivo P4 em vacas induzidas a ovular com ECP pode ser devido à baixa produção de estradiol (BÓ et al., 2018) associada a um pequeno folículo dominante (SA FILHO et al., 2010; PFEIFER et al., 2020). Assim, vacas que não expressam cio até o momento da IATF podem estar destinadas a ter uma ovulação atrasada ou nenhuma ovulação. Foi relatado que ovulações retardadas ocorreram em protocolos baseados em GnRH (THOMAS, et al., 2014). Assim, foi observado uma melhora na fertilidade de vacas que não expressaram cio, retardando o tempo de IA e/ou administrando GnRH antes ou no momento da IATF (HILL, et al, 2016). Para protocolos baseados em estradiol e progesterona, Cedenõ et al. (2021) relatou que o atraso da IATF e o tratamento com GnRH antes da IATF em animais que não expressaram cio acelerou o tempo de ovulação e aumentou P/AI.

Perry et al. (2014) relatou que vacas que expressaram cio tiveram um aumento nas concentrações de estradiol após a aplicação da PGF2α em comparação com vacas que não exibiram cio. O aumento das concentrações de estradiol exerce influencia direta no fluido do trato reprodutivo, tornando o mais abundante, aquoso e menos viscoso e, esse fluído favorece o deslocamento do espermatozoide até o local de fertilização (ROELOFS et al., 2010). Além

disso, vacas que expressaram comportamento de cio próximo à IA tiveram uma melhora significativa no perfil da expressão gênica do endométrio, crítica para suprimir o sistema imunológico materno local e adesão entre o endométrio células epiteliais e do concepto, além de inibir parcialmente o mecanismo de mRNA para a síntese de PGF2α, responsável pela luteolise (DAVOODI et al., 2016). Outra característica encontrada nas vacas em cio é o acúmulo de glóbulos brancos nas camadas sub epiteliais da mucosa uterina congestionada. Esses glóbulos brancos desempenham uma função muito importante para a saúde uterina, uma vez que, os leucócitos polimorfonucleares são mobilizados para o lúmen uterino, onde fagocitam bactérias, restos celulares e espermatozoides mortos ou em vias de morte (ROELOFS et al., 2010).

3.3 Métodos de avaliações de cio

3.3.1 Observação visual

A detecção do cio por meio da observação visual é frequentemente citada como uma prática comum para o rebanho leiteiro, mas pouco adotada em bovinos de corte devida a sua criação de modo extensivo. Mas de modo geral, os métodos visuais mais confiáveis baseiam-se em observações de vacas em pé que aceitam ser montadas e o repouso da cabeça no dorso de outras vacas, o que é facilmente facilitado em alojamentos, mas é limitado quando as vacas são mantidas em sistemas extensivos. A capacidade de detectar uma vaca em cio depende principalmente da experiência e do tempo investido na detecção do cio. É importante que reconheça e interprete vários comportamentos que indicam que uma vaca está em cio, uma vez que, o momento da observação no dia, o tempo gasto na detecção do estro e a frequência têm um grande efeito nas taxas de detecção do estro (ROELOFS, et al., 2005).

3.3.2 Rufiões

A detecção do cio com base no comportamento de monta exige a presença de outros bovinos. Assim, a identificação de vacas em cio também pode ser realizada com o auxílio de um rufião auxiliado com dispositivos de marcação como Estrotect®, bastão marcador e dispositivos radiotelemétricos. Estes animais são mais propensos a identificar fêmeas verdadeiramente “em cio” e aquelas com expressão de cio curta ou fraca. Os rufiões podem ser um touro alterado cirurgicamente para impossibilitar a exteriorização do pênis e a realização cópula. O objetivo desses animais é auxiliar na detecção de vacas em comportamento de cio ativando os dispositivos detectores de cio (MORGAN & DAWSON, et al., 2008).

3.3.3 Bastão marcador e Estrotect®

Os marcadores de giz ou adesivos detectores de cio demonstraram ser eficientes na identificação de cio, comparável aos dispositivos detectores de montas (NOGUEIRA, 2019). Devido ao comportamento de aceitação de monta que as vacas exibem durante o cio, a marcação na região da base da cauda é usada para identificar vacas que expressaram cio em grandes rebanhos. Na base da cauda é aplicada um adesivo (Estrotect®) ou giz no momento da remoção do implante de progesterona. Se no momento da IATF, for observada a remoção da tinta, isso indica que a vaca foi montada e possivelmente está em cio. O uso de bastão ou adesivos para avaliação do cio em pé é prático e eficiente para indicar a expressão de cio mas não avalia sua intensidade (SA FILHO et al., 2011).

3.3.4 Acelerômetro

Os acelerômetros têm se tornado amplamente utilizados em países desenvolvidos para medir o aumento nas atividades físicas de vacas leiteiras, com taxas de detecção de 80 a 90% para o comportamento do cio (SCHEIBE & GROMANN, 2006). Acelerômetros podem coletar remotamente e eficientemente dados detalhados relacionados a medidas de comportamento animal que são processados e usados para monitoramento continuo e em tempo real. O acelerômetro mede as mudanças na velocidade ao longo do tempo e é acoplado ao animal em um local específico para que a orientação do dispositivo possa fornecer informações detalhadas sobre o movimento e a posição corporal em relação ao comportamento de interesse. Este dispositivo é fixado em um local anatômico específico e orientação no corpo por meio do uso de coleiras que são fixadas ao redor do pescoço da vaca, faixas de perna fixadas no lado lateral ou medial do membro anterior ou posterior e brincos que são fixados na orelha (HENDRIKS, et al., 2020).

3.3.5 Dispositivos radiotelemétricos

Os dispositivos radiotelemétricos como o HeatWatch são utilizados para detectar o inicio do cio e para registrar os eventos associados ao comportamento do cio. Estes dispositivos possuem um transmissor sensível à pressão que é aplicado na região sacral anteriormente à cabeça da cauda com uma cola para registrar todos os momentos que o animal é montado. Este sensor na vaca é ativado pelo peso de um animal em montagem por um mínimo de 2 segundos para limitar o número de resultados falso-positivos. Os dados são enviados via rádio e gravados pelo software de gerenciamento de um computador da fazenda para registrar o animal, data (dia, mês e ano), hora (hora, minutos e segundos) e duração da monta (DRANSFIELD, et al., 1998).

3.3 Análise espermática assistida por computador (CASA)

A análise espermática assistida por computador (CASA) é um sistema automático (hardware e software) utilizado para visualizar, analisar e comparar imagens sucessivas de espermatozoides, fornecendo informações precisas e objetiva do movimento individual de cada espermatozoide bem como de subpopulações de espermatozoides com diferentes características de velocidade e movimento (AMANN E KATZ, 2004; MARQUEZ et al., 2007). Assim, a disponibilidade das informações registradas por computador facilita a comparação dos resultados e permite detectar possíveis diferenças nos parâmetros seminais em diferentes situações (PALACÍN et al., 2013). O sistema CASA permitem o cálculo de vários parâmetros de motilidade, que caracterizam o movimento de espermatozoides individuais como (JEULIN et al., 1996; DIDION, 2008; MORTIMER, 1997; MORTIMER, 2000):

- **Velocidade curvilínea (VCL - µm/s):** a velocidade média do caminho da cabeça do esperma ao longo de sua trajetória real.
- **Velocidade em linha reta (VSL - µm /s):** a velocidade média do caminho da cabeça do esperma ao longo de uma linha reta de sua primeira à última posição.
- **Velocidade média do caminho (VAP - µm /s):** a velocidade média da cabeça do esperma ao longo de sua trajetória média.
- **Porcentagem de linearidade (LIN - %):** a razão entre VSL e VCL.
- **Porcentagem de retilinearidade (STR - %):** a relação entre VSL e VAP.
- **Coeficiente de oscilação (WOB - %):** a proporção entre VAP e VCL.
- **Amplitude média de deslocamento lateral da cabeça (ALH - µm):** o valor médio do movimento extremo de lado a lado da cabeça do esperma em cada ciclo de batimento,
- **Frequência cruzada de batimento flagelar (BCF - Hz):** a frequência com que a trajetória real dos espermatozoides cruza a trajetória média do caminho.

O CASA foi introduzido na década de 90 na andrologia veterinária, utilizando a terminologia "CASA" para descrever qualquer tipo de análise espermática auxiliada por computador. Entretanto, atualmente a terminologia CASA é seguido por uma abreviatura da análise a ser realizada, ou seja, CASA-Conc (para concentração), CASA-Mot (para motilidade, incluindo cinética), CASA-Morph (para morfologia, incluindo morfometria) e CASA-DNA (quando o DNA está sendo estudado). Eles podem ser estendidos, se necessário, para indicar quando os corantes fluorescentes são usados para morfologia (CASA-Morph-F) ou quando a fragmentação de DNA está sendo avaliada (CASA-DNAf; DIDION, 2008).

A maioria desses sistemas é baseada na identificação da posição do centroide da cabeça do espermatozoide na primeira imagem da sequência que deve ser vinculada à nova posição, continuando da mesma forma até a última imagem (BOMPART, et al., 2018). Esses sistemas facilitam as avaliações da concentração e motilidade dos espermatozoides em comparação ao uso do método manual tradicional, entretanto o uso tem algumas limitações que devem ser consideradas em relação ao uso tanto em clínicas quanto na produção de doses de sêmen a serem utilizadas para IA. Vários fatores podem gerar uma variabilidade na estimativa dos parâmetros das características dos espermatozoides mensurados pelo CASA, entre os quais podem-se citar o observador, diluição da amostra, calibrações de software, configuração da câmera de vídeo e taxa de quadros usada para captura de imagem, número de campos analisados e o tipo e profundidade da câmara de contagem em quais espermatozoides são avaliados (BOMPART, et al., 2019).

3.4 Motilidade espermática

A avaliação da fertilidade do macho é baseada principalmente na avaliação do sêmen pós-descongelamento, usando parâmetros convencionais como motilidade espermática, morfologia, viabilidade, enzimas, integridade da membrana e do acrossomo. Destes parâmetros citados, acredita-se que a motilidade é um dos parâmetros mais importantes usados na avaliação da qualidade do sêmen, fornecendo informações importantes sobre o status energético do esperma de mamíferos e capacidade de fertilização dos espermatozoides (KATHIRAVAN et al., 2011; PALACÍN et al., 2013). O espermatozoide é uma célula dinâmica, com vias bioquímicas ativas que modificam a fisiologia do espermatozoide ao longo da maturação, ejaculação, transporte no trato genital feminino e fertilização. O batimento flagelar é afetado por essas mudanças, portanto, os espermatozoides mostram diferentes padrões de natação no epidídimo, plasma seminal, muco cervical, oviduto (capacitação) e ao penetrar no oócito (MARTÍNEZ-PASTOR, et al, 2011). Os espermatozoides de mamíferos recém-ejaculados são ativamente móveis, mas são incapazes de fertilizar um oócito. Assim, os espermatozoides precisam passar um período de tempo no trato reprodutivo feminino para se tornarem competentes para a fertilização. As complexas mudanças fisiológicas que conferem aos espermatozoides a capacidade de fertilizar são coletivamente denominadas "capacitação" (YANAGIMACHI, 1994).

Diversos estudos já demostraram a existência de três classes de motilidade espermática; motilidade progressiva para frente ou não hiperativada, fase de transição para motilidade

hiperativada e motilidade hiperativada. Essas características de motilidade podem variar entre touros e até entre ejaculados do mesmo touro e, assim, estudos vêm sendo conduzido para classificar essas partidas de sêmen. São considerados espermatozoides não hiperativos aqueles que apresentam menores valores para VCL e ALH e maior LIN, representando assim, o padrão de motilidade "progressiva para frente", que conduz o esperma em uma linha mais ou menos reta. Na motilidade de "Fase de transição" é um padrão de motilidade geralmente exibido por espermatozoides fisiologicamente normais que estão progredindo para hiperativação, caracterizado por ALH e VCL mais alto e valores mais baixos de LIN (BURKMAN, 1984; MORTIMER E MORTIMER, 1990).

A motilidade hiperativada do espermatozoide foi relatada pela primeira vez por Yanagimachi et al. (1969), que observou que o espermatozoide se tornou extremamente ativo à medida que ganhava a capacidade de fertilizar oócitos in vitro. Ele propôs que o movimento vigoroso desempenhava um papel vital na penetração da zona pelúcida e que foi confirmada por Stauss et al. (1995), que demostrou que os espermatozoides de hamster hiperativados tiveram muito mais sucesso na penetração de zona pelúcida e de oócitos in vitro do que aqueles que não o foram hiperativados. Também foi proposto, com base em observações do comportamento dos espermatozoides de roedores nos ovidutos, que essa hiperativação ajuda os espermatozoides a ultrapassar a mucosa do oviduto e aumentar as chances de encontrar oócitos, devido a suas mudanças frequentes de direção e permitir que o espermatozoide se solte da mucosa oviduto, à qual muitos ficam ligados (SUAREZ & OSMAN, 1987).

As características do sêmen hiperativado é encontrada durante o processo de capacitação, esses espermatozoides desenvolvem esses padrões de motilidade, caracterizados pelo desenvolvimento de batimentos flagelares assimétricos e de alta amplitude, causando movimento vigoroso, às vezes não-direcional (SUAREZ et al, 1983). Entretanto, estudos recentes demostraram que essas características de motilidade não é um fenômeno associado exclusivamente durante o processo de capacitação. Vários autores já relataram a existência de espermatozoides com características de sêmen hiperativado em sêmen pós descongelamento (BAUMBER & MEYERS, 2006; PFEIFER et al., 2019).

3.5 Subpopulações de espermatozoide

Vários trabalhos suportam a hipótese de que qualquer ejaculação de mamífero constitui uma população heterogênea de espermatozoides dentro da qual coexistem subpopulações funcionalmente diferentes (CURRY & WATSON, 1994, HOLT, 1995). Diferentes

subpopulações de espermatozoides foram identificadas em ejaculados de mamíferos com base nas características de motilidade apresentadas por espermatozoides individuais. A existência de quatro subpopulações de espermatozoides móveis em uma única ejaculação já foi descrita em sêmen fresco e congelado de touros (MUIÑO, et al. 2009). Alguns pensam que estudar tais subpopulações fornece um meio de quantificar a qualidade do esperma em maior extensão do que confiar apenas em valores médios para toda a ejaculação, o que simplifica demais a análise e pode mascarar os efeitos de vários tratamentos sobre os espermatozoides (IBANESCU et al. 2015).

Embora a identificação de subpopulações de espermatozoides móveis com base em dados CASA tenha começado a ocorrer há mais de 2 décadas, esse procedimento ainda não foi estabelecido como um processo padrão para análise de sêmen. Além disso, a análise de agrupamento é um procedimento relativamente complexo e existem várias abordagens de agrupamento que podem ser usadas (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2011), ao passo que a escolha do procedimento mais preciso não é simples. Existem muitos impedimentos na determinação das subpopulações do sêmen e como os benefícios de fazer isso não são óbvios, não houve muito progresso nesta área de estudo. Como resultado, há uma grande quantidade de dados resultantes do uso dos sistemas CASA que são negligenciados na prática. Mais pesquisas, portanto, devem ser realizadas para identificar a metodologia mais eficaz para realizar agrupamento de espermatozoides, e até mesmo desenvolver outros métodos personalizados (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2011; IBANESCU, et al., 2015).

4. ARTIGO

Grau de hiperativação espermática e cio na prenhez de vacas de corte inseminadas em tempo fixo

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito do grau de hiperativação espermáticae do cio na prenhez de vacas inseminadas em tempo-fixo. No Experimento 1, 24 vacas Nelore foram submetidas a um protocolo baseado em estradiol e progesterona ([2 mg BE (Gonadiol®, Zoetis) + CIDR® (Zoetis) no D0 / 12,5mg $PGF_2\alpha$ (Lutalyse®, Zoetis) + 1 mg ECP (E.C.P.®, Zoetis + 300 UI eCG (Novormon®, Zoetis) – CIDR® no D8 / IATF 48 h] e um dispositivo detector de cio (Estrotect®) foi colado na região sacro-caudal. Após a remoção do CIDR, o folículo dominante foi monitorado por ultrassonografia a cada 12 horas até a ovulação. Após o diagnóstico de gestação, 12 vacas não gestantes foram ressincronizadas com o mesmo protocolo. Portanto, as vacas foram separadas em 2 grupos de acordo com o momento da detecção do cio: 1) Cio 48h (n = 19), vacas que expressaram cio e Sem cio (n = 17), vacas que não apresentaram cio até 48 h após remoção do CIDR. Vacas que expressam cio antes da IATF ovularam mais cedo (P<0,02) do que as vacas não expressam cio até o momento da IATF (73,3 ± 13,1 vs. 95,5 ± 37,5h). No Experimento 2, 473 vacas Nelore foram submetidas ao mesmo protocolo de IATF descrita no Experimento 1. Na IATF, foram utilizadas 2 partidas de cada um dos 3 touros. As partidas foram analisadas pelo CASA e classificadas de acordo com a velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e linearidade (LIN), da seguinte forma: Hiperativado (H+; LIN < 51,3%, ALH > 7,5 μm and VCL > 164 μm/s), e não hiperativado (H-; LIN > 54,8%, ALH < 6,1 μm and VCL < 139 μm/s), conforme descrito anteriormente (Pfeifer et al. 2019): o sêmen H + e H- de cada um dos touros escolhidos foram distribuído homogeneamente em grupos de acordo com a expressão de cio (Cio até 48 h, Cio; e Sem Cio, SCio). Assim, após a distribuição, os grupos foram: CioH+ (n=144), CioH- (n=148), SCioH+ (n=112) e SCioH- (n=69). No Experimento 2, não houve efeito do grau de hiperativação espermática (P = 0,19) e interação entre o grau de hiperativação espermática e cio (P <0,01). Os grupos CioH + (60,4%, 87/144) e CioH- (66,9%, 99/148) tiveram uma maior P/IA (P <0,02) em comparação aos grupos SCioH + (49,1%, 55/112) e SCioH- (47,8%, 33/69). Vacas que expressam cio até 48 horas após a remoção da P4 ovulam mais cedo e têm maior probabilidade de concepção na IATF do que as vacas que não expressam cio. No entanto, o grau de hiperativação espermática não afetou a fertilidade de vacas de corte, independentemente da ocorrência de cio.

Palavras-chaves: Detecção de cio, cinética espermática, momento da ovulação.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of sperm hyperactivation on fertility of postpartum beef cows that displayed estrus or not in timed AI. In Experiment 1, 24 Nelore cows were included in a estradiol-progesterone based protocol ([2 mg BE (Gonadiol®, Zoetis)+ CIDR® (Zoetis) on D0 / 12.5 mg $PGF_2\alpha$ (Lutalyse®, Zoetis) + 1 mg ECP (E.C.P.®, Zoetis) 300 UI eCG (Novormon®, Zoetis) – CIDR® on D8 / TAI 48 h] and a estrus detector device (Estrotect®) were placed in the sacrocaudal region. After CIDR removal, the dominant follicle was monitored by ultrasonography every 12 h until the ovulation. After pregnancy detection, 12 non-pregnant cows were resynchronized with the same protocol. Therefore, cows were separated according to the moment of estrus detection in 2 groups: 1) Estrus 48h (n =19), cows

that display estrus, and No Estrus (n =17), cows that did not display estrus until 48 h after P4 removal. Cows that were detected in estrus before TAI ovulated earlier (P<0,02) than cows not detected in estrus (73.3±13.1 vs. 95.5±37.5h). In Experiment 2, 473 postpartum Nelore cows were subjected to the same TAI protocol of the Experiment 1. For TAI procedure, 2 batches from each of the 3 bulls were used. Batches were analyzed by CASA and were classified, according to the curvilinear velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), and linearity (LIN), as follows: Hyper-activated (H+; LIN < 51.3%, ALH > 7.5 μm and VCL > 164 μm/s), and Non-Hyper-activated (H-; LIN > 54.8%, ALH < 6.1 μm and VCL < 139 μm/s) as described previously (Pfeifer et al. 2019): H+ and H- semen from each of the chosen bulls were distributed homogeneously into the estrus group of cows (Estrus at 48 h, E; and Non Estrus, NE). Thus, after distribution, the groups were: EH+ (n=144), EH- (n=148), NEH+ (n=112), and NEH- (n=69) for experiment 2. In Experiment 2, there were no effects of sperm kinectics (P = 0.19) and interaction between sperm kinematics and estrus (P = 0.34) in the pregnancy per AI (P/AI). However, there was an effect of estrus expression (P<0.01). The EH+(60.4%, 87/144) and EH- (66.9%, 99/148) groups had a greater P/AI (P<0.02) in comparison to the NEH+ groups (49.1%, 55/112) and NEH- (47,8%, 33/69). Cows that displayed estrus within 48 hours after P4 removal ovulate earlier and are more likely to become pregnant than cows that did not display estrus. However, sperm kinematics did not affect the fertility of beef cows regardless of the estrus occurrence.

Keywords: estrus detection; sperm kinematics; moment of ovulation.

INTRODUÇÃO

Na América do Sul, os protocolos de sincronização baseados em estradiol e progesterona tem sido utilizado com sucesso para controlar a dinâmica folicular, lútea e para sincronizar a ovulação, permitindo a IA sem a detecção de cio. No entanto, vários estudos demostraram que vacas que expressam cio antes da IATF tiveram maiores taxas de prenhez/IA e uma probabilidade de 3,3 vezes maior de ficarem prenhas quando comparadas a fêmeas que não expressaram cio até o momento da IATF (SA FILHO et al., 2010; PERRY et al., 2007; RICHARDSON et al., 2016). Durante o estro, as concentrações de estradiol atingem o pico aproximadamente 36 h antes da ovulação (CHENAULT, 1975) e as concentrações pré-ovulatórias aumentadas de estradiol influenciam o transporte espermático (HAWK, 1983), resultando em maior sucesso da fertilização, melhor qualidade e viabilidade do embrião (MILLER, 1976; JINKS, 2013) e uma melhora > 60% no sucesso da prenhez (PERRY, 2005, 2008).

Para o sucesso da IA é necessário avaliar outros fatores que comprometem a fertilidade, como por exemplo, a qualidade do sêmen dos touros. Embora as centrais de IAs selecionam touros geneticamente superiores e com ejaculados de alta qualidade, a fertilidade ainda é variável entre touros e até entre os ejaculados do mesmo touro, indicando a necessidade de critérios mais rigorosos para identificar os ejaculados adequados para IA (IBANESCU et al.,

2020). Com a evolução das técnicas de avaliação de sêmen nas ultimas décadas, especialmente com a incorporação da tecnologia de análise de sêmen assistida por computador (CASA), foi possível obter informações precisas e significativas sobre a concentração, motilidade, morfologia e outras variáveis relacionadas à qualidade do sêmen (YÁNIZ et al., 2015a; YÁNIZ et al., 2015b; LU et al., 2014). Assim, com o uso do CASA para medir as variáveis de espermatozoides, foi possível classificar amostras com baixa motilidade e identificar espermatozoides com padrões de motilidade hiperativos. Os espermatozoides hiperativos são caracterizados por um movimento vigoroso e não linear, causado por uma amplitude aumentada de batimentos flagelares. E essas características de motilidade são importantes para a função espermática, pois auxilia na capacidade do espermatozoide transitar pelo trato reprodutivo feminino e fecundar o oócito (SCHMIDT & KAMP, 2004).

Estudos que avaliaram a interação da resposta ovariana e o grau de hiperativação espermática observaram um efeito significativo na fertilidade a campo. Neste estudo que utilizou o diâmetro do folículo como indicador do momento da ovulação, observou-se que vacas com folículos menores no dia da IATF tiveram uma menor probabilidade de emprenharem quando foram inseminadas com espermatozoides hiperativos. Em contraste, quando foram inseminados com espermatozoides não hiperativos, tiveram P / IA aceitáveis e semelhantes (PFEIFER et al., 2019). Embora, os resultados desde estudo demostraram um efeito do grau de hiperativação espermática na fertilidade a utilização dessa metodologia é pouca prática para aplicação no campo uma vez que exige um profissional qualificado e ultrassom para mensurar o diâmetro do FPO.

Portanto, a identificação de novos métodos para determinar o momento da ovulação e diferentes padrões de movimento dos espermatozoides pode ser de grande importância para ajudar a estimar a capacidade de fertilização de amostras de sêmen bovino, bem como para fornecer novas ideias para a otimização dos protocolos de IATF, uma vez que, a hiperativação é uma das características da aquisição da capacidade de fertilização dos espermatozoides. Com base nessas considerações o presente estudo tem como objetivo avaliar à associação do grau de hiperativação espermática e cio e na fertilidade de vacas de corte submetidas a IATF. Assim, foi hipotetizado que vacas que expressam cio até 48h após a remoção do implante de progesterona ovulam mais cedo. Além disso, foi hipotetizado que o grau de hiperativação espermática afeta a fertilidade de vacas que expressam cio ou sem cio até o momento da IATF.

MATERIAL E MÉTODOS

O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Embrapa aprovou todos os procedimentos realizados no experimento descrito neste manuscrito (Protocolo 04/2017).

Experimento 1

Este estudo foi realizado para caracterizar o tempo de ovulação de vacas que expressam cio após a remoção do implante de progesterona. A coleta de dados foi realizada na fazenda experimental da Embrapa Rondônia (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Rondônia, Brasil; 8º47'38''Sul e 63º50'46''Oeste). Os animais apresentavam escore de condição corporal 2,75-3,5 (ECC; intervalo de 1-5, onde 1= emaciada e 5 obesa; (ECC; escala 1–5; AYRES, et al., 2009) e eram mantidos em sistemas de pastejo de *Brachiaria brizantha* e com acesso *ad libitum* a água e sal mineral.

Inicialmente 24 vacas primíparas foram submetidas a um protocolo IATF a base de estradiol e progesterona. Todos os animais receberam um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (1,9 g de progesterona, CIDR®, Pfizer Animal Health, São Paulo, Brasil) e 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Gonadiol®, Zoetis, São Paulo, Brasil) por via intramuscular (im) no dia 0 (D0) do protocolo. No dia 8 (D8), o CIDR foi removido e administrado 150 µg de d-cloprostenol im (análogo de PGF2α; Croniben®, Biogénesis-Bagó, Curitiba, Brasil) e 1 mg de cipionato de estradiol (ECP, E.C.P®, Pfizer Animal Health, São Paulo, Brazil) e 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG, Novormon ®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) im. A IATF foi realizada 48 horas após a remoção do implante de progesterona com sêmen convencional (FIGURA 1). Posteriormente, 12 animais foram ressincronizadas com o mesmo protocolo descrito, totalizando 36 IAs.

No momento da remoção do dispositivo intravaginal, os animais receberam um dispositivo detector de cio (Estrotect, Rockway Inc, Spring Valley, WI) para identificar os animais que expressão cio entre a retirada do implante de progesterona e a IATF. A expressão de cio foi definida como a remoção de >50% do revestimento do dispositivo.

Os animais foram submetidos à avaliação ultrassonográfica (SIUI® CTS-900, China) para mensuração do folículo dominante e confirmação da ovulação. O diâmetro e localização dos folículos ≥5 mm foram documentados para ambos os ovários e registrados em mapas individuais para monitoramento posterior. As avaliações foram realizadas a cada 24 horas entre a remoção do implante de progesterona e a IATF, e 12 horas a partir da IATF. A ausência do

POF previamente identificado e eventual presença de CL no mesmo ovário foi critério pra confirmação da ovulação.

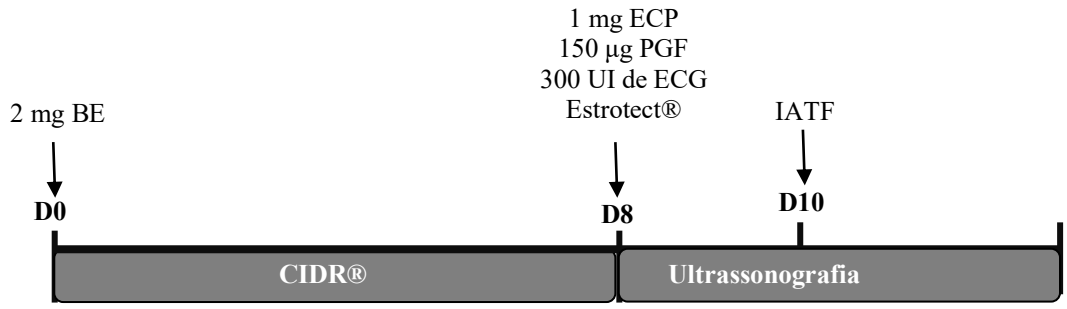

Figura 1: Design do experimento 1 de vacas lactantes submetidas ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

Experimento 2

Foram utilizadas 473 vacas multíparas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) com períodos de pós-parto entre 60-100 dias e ECC 2,5-3,5 (ECC; escala 1–5; AYRES, et al., 2009). Os animais eram oriundos de uma fazenda comercial em Rondônia, Brasil e mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha* com livre acesso a água e sal mineral.

Neste experimento, os animais receberam o mesmo protocolo hormonal descrito no Experimento 1. No momento da remoção do dispositivo intravaginal de P4, todas as vacas foram pintadas na região sacro-caudal com bastão marcador (Raidl-Maxi, RAIDEX GmbH, Dettingen / Erms, Alemanha) para identificar os animais que expressaram cio entre a retirada do implante de progesterona e a IATF. Animais sem 75% da marcação no dia da IA foram considerados positivos para a expressão de cio. A IATF foi realizada 48 horas após a remoção do implante de progesterona. Antes da IATF, os animais foram avaliados por ultrassonografia para mensuração do folículo dominante.

Análise de Sêmen

As partidas de sêmens utilizados neste experimento foram adquiridas de uma central de processamento de sêmen (Seleon Biotecnologia, Itatinga, SP, Brasil). As amostras foram submetidas ao CASA (Ivos-UltiMate®; Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, EUA) para classificação do sêmen conforme o grau de hiperativação espermática. Para cada amostra de sêmen foram avaliadas aproximadamente 100.000 células e todas as análises foram realizadas pelo mesmo técnico. Para caracterizar o sêmen Hiperativo (+) e não hiperativados

(H-) foram seguidos os mesmos critérios adotados por Pfeifer (2019), sendo assim, foram avaliadas as seguintes variáveis: velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e linearidade (LIN). No entanto, o ponto de corte adotado para classificar as partidas em sêmen H (+) e H (-) apresentavam médias diferentes daqueles aplicados por Pfeifer et al. (2019), de modo que, no presente estudo foram considerados: H+ aqueles com maior ALH (7,5 µm) e VCL (164,3 µm/s), e menor LIN (51,3 %) e; H- aquelas que apresentaram menor ALH (6,1 µm) e VCL (139 µm/s), e maior LIN (53,8%). A partir desse critério, foram selecionadas as partidas 3 touros que havia sêmen com características de espermatozoides H (+) e H (-).

Delineamento experimental e tratamentos

Para este estudo, foram utilizadas uma partida de sêmen hiperativo (H +) e não-hiperativo (H -) de cada um dos 3 touros selecionado. As partidas H+ e H- foram usadas na inseminação de vacas que expressaram cio (Cio) e sem expressão de cio (SCio). Assim, após estas atribuições, os animais foram distribuídos para os seguintes grupos: CioH+ (n=144), CioH- (n =148), SCioH+ (n=112) e SCioH- (n=69).

Diagnóstico de gestação

O diagnóstico gestação foi realizado trinta dias após a IATF por meio da ultrassonografia transretal (SIUI CTS-900, sonda linear com MHZ, Guangdong, China). A detecção de uma vesícula embrionária com embrião viável foi usada como indicador de prenhez. A P/IA foi calculada como a proporção de vacas prenhes 30 d após a IATF, dividido pelo total de vacas inseminadas.

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). O modelo estatístico incluiu os efeitos do tratamento, touro, ECC e paridade. As variáveis touro, ECC e paridade não tiveram efeito significativo no modelo, portanto foram excluídas. Os efeitos do diâmetro folicular, expressão de cio, grau de hiperativação espermática e touro foram analisadas pelo procedimento de modelos lineares generalizados (GLM) e o teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças entre tratamentos. As respostas binárias (prenhez/IA) foram avaliadas pelo teste do Qui-quadrado. A relação entre o diâmetro do POF e expressão de cio na IATF e a probabilidade de prenhez foi

determinada para cada grupo de hiperativação espermática (H+ e H-). As curvas de regressão logística foram criadas usando os coeficientes fornecidos pela análise de dados interativa do SAS e a fórmula $y = \exp(\alpha x + b) / [1 + \exp(\alpha x + b)]$. Em todas as análises realizadas, as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1

No Experimento 1, quatro vacas não apresentavam um folículo dominante do D8 do protocolo e, portanto, foram descartadas do experimento. Dos 32 animais que continuaram no experimento, 59,3% (19/32) expressaram cio até 48 horas após a remoção do implante de progesterona e 93,8% (30/32) das vacas ovularam. Os dados referentes as respostas ovarianas estão apresentadas na Tabela 1. Os resultados deste experimento demostraram que vacas que expressaram cio até 48 horas após a remoção do CIDR tenderam a ter um maior folículo (P=0.09) no momento da IATF e ovularam mais cedo em relação as vacas que não expressaram cio (P<0.02).

Tabela 1: Respostas ovarianas de vacas Nelore que expressaram cio e sem cio em até 48 horas a partir da remoção do implante.

	Cio em até 48h	Sem cio em até 48h	Valor de P
Diâmetro do Folículo dominante na IATF (mm)	12.0 ± 0.5	10.8 ± 0.5	0.09
Diâmetro do Folículo pré-ovulatório (mm)*	11.4 ± 1.2	12.2 ± 1.6	0.16
Crescimento por dia do POF (mm)*	1,3	1,5	0.32
Momento da ovulação (horas)**	73.3 ± 13.1[A]	95.5 ± 37.5[B]	0.02
Taxa de ovulação	94.7% (18/19)	92.3% (12/13)	0.78

[AB] Letras diferente na mesma linha, diferem entre si (P<0,05).
* Entre a remoção do CIDR e a ovulação
**Após a remoção do CIDR

Experimento 2

Todos os parâmetros da cinética espermática das partidas avaliadas pelo CASA estão descritos na Tabela 2. No experimento 2, não houve efeito (P=0,10) do grau de hiperativação espermática na fertilidade de vacas que expressaram cio ou sem cio em até 48h após a remoção

da P4 e na interação do grau de hiperativação espermática e cio (P = 0,42). Entretanto vacas que expressaram cio tiveram maior taxa de Prenhez/IA (P<0.05). Os dados para P/IA baseados na expressão de cio (Cio e SCio) e grau de hiperativação espermática (H + ou H-) estão incluídos na Figura 2.

Tabela 2: Análise do sêmen de acordo com os parâmetros da cinética espermática (CASA).

	Cinética espermática	
	Não-hiperativado (H-)	**Hiperativado (H+)**
Motilidade total (%)	37.6 ±4.3	49.3 ± 5.6
Motilidade progressiva (%)	27.1 ± 4.1	36.6 ± 4.6
VAP (µm / s)	86.2 ± 7.5	100.3 ± 6.8
VSL (µm / s)	74.8 ± 6.3	85.5 ± 5.0
LIN (%)	53.8 ± 1.6	51.3 ± 1.7
STR (%)	83.7 ± 0.7	82.2 ± 1
ALH (µm)	6.1 ± 0.5	7.5 ± 0.6
VCL (µm / s)	139 ± 13.9	164.3 ± 13.0

VAP: velocidade média do caminho; VSL: Velocidade em linha reta; LIN: Linearidade; STR: Retidão; ALH: Amplitude do deslocamento lateral da cabeça; VCL: velocidade curvilínea.

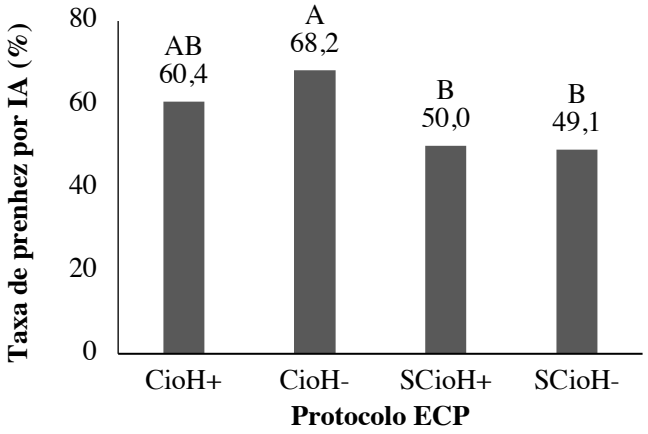

Figura 2: Taxa de prenhez do experimento 2 de vacas de corte inseminadas com sêmen (H+ ou H-) em relação aos animais que expressaram cio ou não até o momento da IATF; Letras diferentes indicam efeito entre os grupos (P <0,05).

Apenas 256 animais foram submetidos a mensuração do diâmetro do POF no dia da IATF. Vacas que expressaram cio tinham maior diâmetro do POF do que vacas que não expressaram cio. Além disso, a probabilidade de prenhez aumentou conforme o diâmetro folicular aumentava de diâmetro (P = 0.04; FIGURA 3) e a probabilidade da vaca expressar cio aumentava de acordo com aumento do diâmetro do POF (P=0.01; FIGURA 4). Entretanto, não foi observado diferenças entre o grau de hiperatividade espermática e interação cio*hiperatividade. As médias do diâmetro do POF estão descritas na Tabela 2.

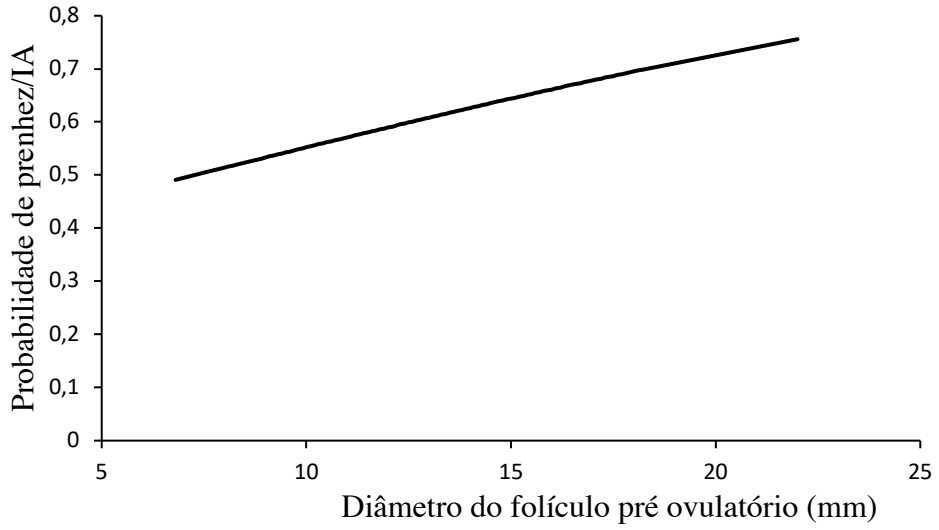

Figura 3: Probabilidade de prenhez de acordo com o diâmetro do folículo dominante (P = 0.04).

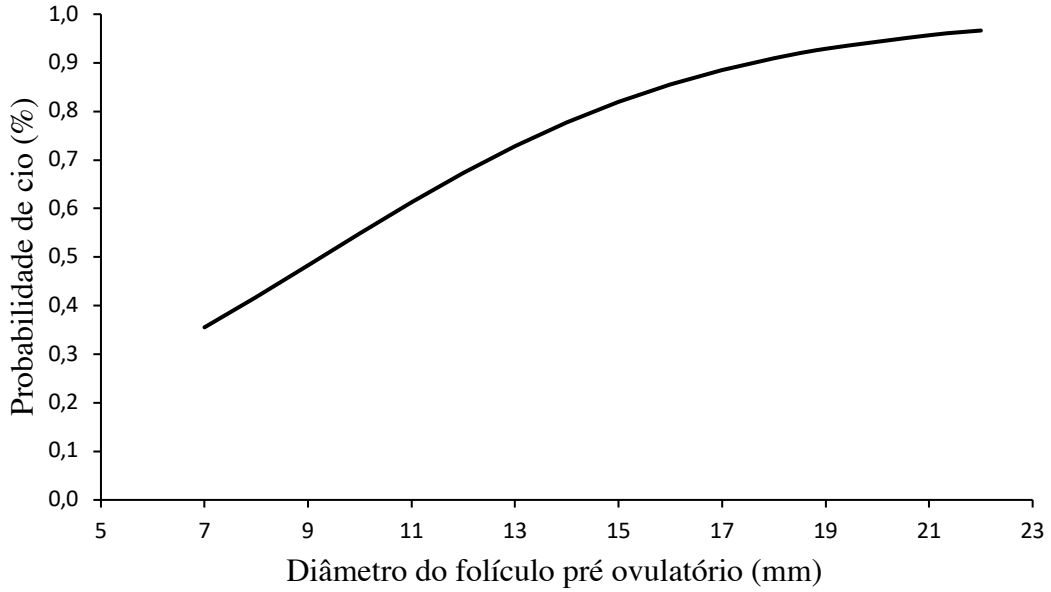

Figura 4: Probabilidade de cio de acordo com o diâmetro do folículo dominante (P = 0.01).

Os dados para P/IA geral com base na classificação da expressão cio (Cio ou sem cio até 48h após a remoção do implante de progesterona) e hiperatividade espermática (H+ ou H-) estão incluídos na Tabela 2. Na P/IA geral não foi observado o efeito do grau de hiperatividade na fertilidade, entretanto, vacas que expressaram cio tiveram maior taxa de prenhez comparado as vacas que não expressaram cio até 48h após a remoção do implante de progesterona.

Tabela 3. Taxa de prenhez e diâmetro do folículo pré ovulatório de acordo com a expressão de cio e o grau de hiperativação espermática.

	Expressão de cio		**Grau de Hiperatividade**		**Valor de P**		
	Cio	**Sem cio**	**H+**	**H-**	**Cio**	**Hiperatividade**	**Cio*Hiperatividade**
Prenhez / IA	63,6% (186/292) [A]	48,6% (88/181) [B]	55,4% (142/256)	60,8% (132/217)	0,07	0.25	0,40
POF (mm)	13,5 ± 0,2[A]	12,1 ± 0,3[B]	13,3 ± 0,2	13,0 ± 0,2	0,001	0,38	0,35

[AB] Letras diferentes indicam diferença entre os grupos (P<0.05).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo confirmaram a hipótese de que vacas que expressam cio até 48h após a remoção do implante de progesterona ovulam mais cedo em relação aos animais que expressam cio após 48 horas. No entanto, a hipótese de que o grau de hiperativação espermática afeta a fertilidade de vacas que expressam cio ou não até o momento da IATF não foi sustentada.

Os pontos chaves para melhorar os índices de prenhez nos programas de IATF é submeter as fêmeas a IA no momento mais próximo da ovulação (SAACKE, 2008; STANFORD et al., 2002). Esta relação foi bem descrita no estudo de Pfeifer et al. (2015), onde foi demonstrado que a mensuração do POF no momento da IATF poderia ser um indicador para prever o tempo da ovulação. Assim, a partir do atraso da IATF com base no diâmetro do POF foi observado uma maior taxa de P/AI por consequência da maior sincronia entre o momento da IATF e o momento da ovulação. No presente estudo, a identificação da expressão do cio em até 48h após a remoção do implante de progesterona demostrou ser uma alternativa para classificar os animais que ovularam mais cedo. Assim, estimar o momento da ovulação com base na resposta de cio pode representar uma prática importante para melhorar a fertilidade em protocolos de IATF.

Nogueira et al. (2019) concluiu que a expressão de cio influencia nas taxas de prenhez de vacas de corte submetidas a IATF e o uso dos dispositivos detectores de cio como os bastões marcadores é uma estratégia simples e útil para atingir maiores índices de fertilidade. Estudos já relataram que vacas que expressam cio apresentam maior diâmetro do POF na IATF, maiores taxas de ovulação e consequentemente maiores taxas de prenhez (RODRIGUES et al., 2019). No presente estudo, vacas que expressaram cio tenderam a ter maior diâmetro folicular no momento da IATF, entretanto, não foi observado esta relação na taxa de ovulação. Esse efeito não encontrado no presente estudo deve-se possivelmente ao baixo número de animais utilizados, portanto, um experimento com maior número de animais poderia confirmar os efeitos da expressão de cio nas demais respostas ovarianas.

No Experimento 2, não foram observado uma associação entre o grau de hiperativação espermática e cio na fertilidade de vacas submetidas a IATF. Entretanto, vacas que expressaram cio apresentaram maior taxa de P/IA em comparação aos animais que não expressaram cio em até 48 horas após a remoção do implante. Essa maior taxa de prenhez é resultante da maior sincronização entre a IATF e a ovulação, uma vez que, a expressão de cio é um indicador da ovulação precoce como já foi demostrado no experimento 1 e, vacas que expressam cio atingem

o pico de concentrações circulantes de estradiol, e essas concentrações de estradiol no período da inseminação alteram o ambiente uterino favorecendo no deslocamento do espermatozoide no trato reprodutivo feminino até o local de fertilização e no processo de fertilização do oócito. Embora os protocolos de IATF dispensem a necessidade da detecção do cio, vários trabalhos já relataram o efeito positivo da expressão do cio próximo do momento da IATF (PFEIFER et al, 2020; SÁ FILHO et al, 2011).

O sucesso dos programas de IA de bovinos depende do uso de sêmen de boa qualidade e melhores taxas de concepção podem ser alcançadas com animais de alta fertilidade durante as estações reprodutivas. Embora os touros de elite de centros comerciais de IA atendem aos padrões mínimos de qualidade do sêmen, esses animais diferem em sua fertilidade (SUDANO et al., 2011). Assim, o CASA passou ser uma ferramenta fundamental para avaliar a fertilidade desses touros, uma vez que, o CASA possibilitou avaliar várias características em uma grande amostra de sêmen e com alta repetitividade. No presente estudo, os parâmetros de interesse são aqueles relacionados a motilidade, visto que, nos mamíferos a motilidade é importante para o transporte de espermatozoides no trato reprodutivo feminino e para a fecundação no oócito (DORADO et al, 2013). O CASA foi utilizado para determinar o grau de hiperativação espermática das partidas de sêmen, foram utilizados os valores médios de VCL, LIN e ALH em relação às médias das amostras avaliadas. Após análise no CASA, o sêmen só foi considerado hiperativo se os valores de VCL e ALH fossem maiores que a média e o valor LIN menor que a média. Em contraste, o sêmen só foi considerado não-hiperativado se os valores de VCL e ALH fossem menores do que a média e o LIN fosse maior que a média. Os valores médios do grau de hiperativação espermática utilizadas nesse experimento apresentavam características cinéticas típicas de sêmen H-. Entretanto, o grau de hiperativação espermática do sêmen H+ não se apresentavam médias tão distintas a ponto de observarmos diferenças na fertilidade, podendo ser classificadas como motilidade de transição para Hiperativada. Isso se torna mais evidente quando comparamos a cinética das partidas utilizadas por Pfeifer et al. (2019) para determinar a motilidade hiperativa em sêmen de bovinos de corte (VCL 195 μm / s, LIN 49 % e ALH 9 μm). Quando comparamos o efeito da interação entre diâmetro do POF e o grau de hiperativação espermática também não foi observado o efeito do sêmen hiperativo destacado por Pfeifer (2019). Portanto, é provável que ponto de corte adotado no presente estudo pode ter mascarado o efeito do grau de hiperativação espermática na fertilidade.

Embora os 3 touros selecionados para estudo, não apresentaram diferenças na fertilidade, ambos apresentaram variação nos padrões de motilidade espermática. O estudo do

efeito do sêmen hiperativo na fertilidade é importante para identificar a influência dessa característica na fertilidade de vacas, uma vez que, o processo de hiperativação é importante para a fertilização do oócito e, este processo de hiperativação é altamente consumidor de ATP e se iniciada muito cedo, a hiperativação representa um risco de esgotamento do estoque de energia dos espermatozoides antes que essas células cheguem ao oócito para a fertilização (MORTINER et al., 1997; SUAREZ & HO, 2003).

Os ésteres de estradiol, como o ECP, têm sido utilizados com sucesso para indução e sincronização da ovulação em vacas de corte e esse protocolo tem apresentado bons resultados na taxa de prenhez. Comumente, nos protocolos convencionais de IATF, a administração do ECP ocorre no momento da remoção do implante de P4, resultando em ovulações de aproximadamente 68,5 após a remoção do implante de P4 (SALES et al., 2012; MANEGHETTI et al., 2009). Embora este protocolo demostrou ser eficiente, alguns trabalhos relataram o efeito do cio comportamental induzido pelo ECP em vacas ovariectomizadas (PFEIFER et al., 2020) e, devido a essas características do ECP de induzir um falso cio, o efeito do grau de hiperativação espermática na fertilidade pode ter sido mascarado pela inclusão de animais que não expressaram um cio verdadeiro.

Em conclusão, vacas que expressam cio até 48 horas após a remoção da P4 ovulam mais cedo e têm maior probabilidade de terem um POF de maior diâmetro e maior probabilidade de concepção na IATF do que as vacas que não expressam cio. No entanto, o grau de hiperativação espermática não afetou a fertilidade de vacas de corte, independentemente da ocorrência de cio. Assim, baseado nessas considerações acreditamos que seria importante conduzir novos experimento com partidas de sêmen que apresentam um grau de hiperativação espermática mais hiperativada (H+) do que as utilizadas nesse experimento.

REFERÊNCIAS

Agência de Defesa Sanitária Agrossilvopastoril de Rondônia – IDARON. **Relatórios de Campanhas de Vacinação 2007 a 2019**. Online. Disponível em: <http://www.idaron.ro.gov.br/index.php/relatorios-e-formularios/>. Acesso em: 20 julho 2020.

ALLRICH, R. D. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2738-2744, 1994.

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Andrology lab corner*: Reflections on casa after 25 years. **Journal of andrology**, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.

ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOSKINEN, E.; DAHLBOM, M. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. **Theriogenology**, v. 61, n. 7-8, p. 1583-1588, 2004.

ANUALPEC. (2018). Anuário da Pecuária Brasileira (20th ed. Vol. 1). São Paulo, São Paulo, Brasil: Instituto FNP.

Associação Brasileira de Indústrias Exportadoras de Carne - ABIEC. **Perfil Report: Perfil da Pecuária no Brasil**. 2019. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2019/>. Acesso em: 20 julho 2020.

Associação Brasileira de Inseminação Artificial – ASBIA. **Index ASBIA 2019.** Disponível em: <http://www.asbia.org.br/wp-content/uploads/2020/02/Index-asbia-1.pdf> Acesso 02 jun. 2020.

AYRES, H., FERREIRA, R. M., DE SOUZA TORRES-JÚNIOR, J. R., DEMÉTRIO, C. G. B., DE LIMA, C. G., & BARUSELLI, P. S. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (Bos indicus) cows. **Livestock Science**, v. 123, n. 2-3, p. 175-179, 2009.

AYRES, H.; MARTINS, C. M.; FERREIRA, R. M.; MELLO, J. E.; DOMINGUEZ, J. H.; SOUZA, A. H.; VALENTIN, R.; SANTOS, I. C. C.; BARUSELLI, P. S. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (Bos indicus) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 77-78, 2008.

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 anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 479-486, 2004.

BARUSELLI, P.S. Avaliação do mercado de IATF no Brasil (2019). Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 3a ed., 2020. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/ >Acesso em: 20 de maio de 2019

BARUSELLI, P.S. Avaliação do mercado de IATF no Brasil. Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 1. ed., 2019. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/> Acesso em: 20 de maio de 2019

BARUSELLI, PIETRO. IATF gera ganhos que superam R$ 3,5 bilhões nas cadeias de produção de carne e de leite. Revista Attalea Agronegócios. Disponível em: <https://revistadeagronegocios.com.br/iatf-gera-ganhos-que-superam-r-35-bilhoes-nas-cadeias-de-producao-de-carne-e-de-leite/>. Acesso em: 20 de maio de 2019

BAUMBER, J.; MEYERS, S. A. Hyperactivated motility in rhesus macaque (Macaca mulatta) spermatozoa. **Journal of andrology**, 27(3), 459-468, 2006.

BÓ, G. A., & CEDEÑO, A. Expression of estrus as a relevant factor in fixed-time embryo transfer programs using estradiol/progesterone-based protocols in cattle. **Animal Reproduction** (AR), v. 15, n. 3, p. 224-230, 2018.

BO, G. A., ADAMS, G. P., PIERSON, R. A., & MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 31-40, 1995

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in Bos indicus cattle. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3-4, p. 307-326, 2003.

BÓ, G. A.; CUTAIA, L.; PERES, L. C.; PINCINATO, D.; MARAÑA, D.; BARUSELLI, P. S. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of Bos indicus cattle. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 64, p. 223, 2007

BOMPART, D.; VÁZQUEZ, R. F.; GÓMEZ, R., VALVERDE, A.; ROLDÁN, E. R., GARCÍA-MOLINA, A.; SOLER, C. Combined effects of type and depth of counting chamber, and rate of image frame capture, on bull sperm motility and kinematics. **Animal reproduction science**, v. 209, p. 106169, 2019.

BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; ŠOŠTARIĆ, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B. M. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1473-1486. e1, 2011.

BUHI, W. C. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. **Reproduction-Cambridge**, v. 123, n. 3, p. 355-362, 2002.
BURKMAN, L. J. Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. **Archives of andrology,** v. 13, n. 2-3, p. 153-165, 1984.

CAVALIERI, J.; COLEMAN, C.; RODRIGUES, H.; MACMILLAN, K. L.; FITZPATRICK, L. A. The effect of timing of administration of oestradiol benzoate on characteristics of oestrus, timing of ovulation and fertility in Bos indicus heifers synchronised with a progesterone releasing intravaginal insert. **Australian veterinary journal**, v. 80, n. 4, p. 217-223, 2002.

CEDEÑO, A. V.; CUERVO, R.; TRÍBULO, A.; TRÍBULO, R.; ANDRADA, S.; MAPLETOFT, R.; BÓ, G. A. Effect of expression of estrus and treatment with GnRH on pregnancies per AI in beef cattle synchronized with an estradiol/progesterone-based protocol. Theriogenology, v. 161, p. 294-300, 2021.

CHENAULT, J. R.; THATCHER, W. W.; KALRA, P. S.; ABRAMS, R. M.; WILCOX, C. J. Transitory changes in plasma progestins, estradiol, and luteinizing hormone approaching ovulation in the bovine. **Journal of dairy science**, v. 58, n. 5, p. 709-717, 1975.

CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 721-731, 1997.

CREPALDI, G. A.; SALES, J. N. S.; GIROTTO, R. W.; CARVALHO, J. G. S.; BARUSELLI, P. S. Effect of induction of ovulation with estradiol benzoate at P4 device

removal on ovulation rate and fertility in Bos indicus cows submitted to a TAI protocol. **Animal reproduction science**, v. 209, p. 106141, 2019.

CURRY, M. R.; WATSON, P. F. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. **Cryobiology**, v. 31, n. 1, p. 39-46, 199.

DAVOODI, S.; COOKE, R. F.; FERNANDES, A. C. D. C.; CAPPELLOZZA, B. I.; VASCONCELOS, J. L. M.; CERRI, R. L. A. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on day 19 of gestation in beef cows. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 645-655, 2016.

DIDION, B. A análise de sêmen assistida por computador e sua utilidade para o perfil de amostras de sêmen em machos. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, pág. 1374-1376, 2008.

DORADO, J.; ACHA, D.; ORTIZ, I.; GÁLVEZ, M. J.; CARRASCO, J. J.; DÍAZ, B.; HIDALGO, M. Relationship between conventional semen characteristics, sperm motility patterns and fertility of Andalusian donkeys (Equus asinus). **Animal reproduction science**, v. 143, n. 1-4, p. 64-71, 2013.

DRANSFIELD, M. B. G., NEBEL, R. L., PEARSON, R. E., & WARNICK, L. D. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. **Journal of dairy science**, v. 81, n. 7, p. 1874-1882, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Anuário Leite 2019**. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/198698/1/Anuario-LEITE-2019.pdf.> Acesso em: 20 julho 2020

FORTUNE, J. E. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. **Biology of Reproduction**, v. 35, n. 2, p. 292-299, 1986.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 648-654, 2001.

GENTRY JR, G. T.; WALKER, R. S.; GENTRY, L. R. Impacts of incorporation of follicle stimulating hormone into an estrous synchronization protocol for timed artificial insemination of crossbred beef cattle. **Animal reproduction science**, v. 168, p. 19-25, 2016.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1996.

HAFEZ, E. S. E. Hafez, B. Reprodução animal.7.ed. Barueri: Manole, 2004.

HASLER, J. F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1401-1415, 2001.

HAWK, H. W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 12, p. 2645-2660, 198.

HENDRIKS, S. J.; PHYN, C. V. C.; HUZZEY, J. M.; MUELLER, K. R.; TURNER, S. A.;

DONAGHY, D. J.; ROCHE, J. R. Graduate Student Literature Review: Evaluating the appropriate use of wearable accelerometers in research to monitor lying behaviors of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2020.

HILL, S. L.; GRIEGER, D. M.; OLSON, K. C.; JAEGER, J. R.; DAHLEN, C. R.; BRIDGES, G. A.; STEVENSON, J. S. Using estrus detection patches to optimally time insemination improved pregnancy risk in suckled beef cows enrolled in a fixed-time artificial insemination program. **Journal of animal science**, v. 94, n. 9, p. 3703-3710, 2016.

HOLT, W. V. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n. 1, p. 17-24, 1995.

IBANESCU, I.; LEIDING, C.; CIORNEI, Ş. G.; ROȘCA, P.; SFARTZ, I.; DRUGOCIU, D. Differences in CASA output according to the chamber type when analyzing frozen-thawed bull sperm. **Animal reproduction science**, v. 166, p. 72-79, 2016.

IBANESCU, I.; SIUDA, M.; BOLLWEIN, H. Motile sperm subpopulations in bull semen using different clustering approaches–Associations with flow cytometric sperm characteristics and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 215, p. 106329, 2020.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas - IBGE. **Censo Agropecuário 2019.** Disponível em: < https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria.html> Acesso em: 20 julho 2020

JEULIN, C.; LEWIN, L. M.; CHEVRIER, C.; BROSSAULT, D. Changes in flagellar movement of rat spermatozoa along the length of the epididymis: Manual and computer-aided image analysis. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, 1996.

JINKS, E. M.; SMITH, M. F.; ATKINS, J. A.; POHLER, K. G.; PERRY, G. A.; MACNEIL, M. D.; GEARY, T. W. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. **Journal of animal science**, v. 91, n. 3, p. 1176-1185, 2013.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; KARTHIKEYA, G.; RENGARAJAN, K.; KADIRVEL, G. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system–a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 165-172, 2011.

LU, J. C.; HUANG, Y. F.; LÜ, N. Q. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. **Andrologia**, v. 46, n. 4, p. 329-338, 2014.

M. F., SANTOS; J. E. P., FERREIRA; R. M., SALES, J. N. S; BARUSELLI, P. S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled Bos indicus cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology,** v. 76, n. 3, p. 455-463, 2011.

MARQUEZ, B.; IGNOTZ, G.; SUAREZ, S. S. Contributions of extracellular and intracellular Ca2+ to regulation of sperm motility: release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm. **Developmental biology,** v. 303, n. 1, p. 214-221, 2007.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; TIZADO, E. J.; GARDE, J. J.; ANEL, L.; DE PAZ, P. Statistical series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 783-795, 2011.

MARTINEZ, M. F., KASTELIC, J. P., BO, G. A., CACCIA, M., & MAPLETOFT, R. J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal reproduction science**, v. 86, n. 1-2, p. 37-52, 2005.

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, n. 2, p. 179-189, 2009.

MILLER, B. G.; MOORE, N. W. Effects of progesterone and oestradiol on endometrial metabolism and embryo survival in the ovariectomized ewe. **Theriogenology**, v. 6, n. 6, p. 636-636, 1976.

MORGAN, G. L.; DAWSON, L. J. Development of teaser bulls under field conditions. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, n. 3, p. 443-453, 2008.
MORTIMER, S. T. CASA—practical aspects. **Journal of andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.

MORTIMER, S. T.; MORTIMER, D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. **Journal of andrology,** v. 11, n. 3, p. 195-203, 1990.

MORTIMER, S. T.; SCHËVÄERT, D.; SWAN, M. A.; MORTIMER, D. Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa. **Human reproduction** (Oxford, England), v. 12, n. 5, p. 1006-1012, 1997.

MUIÑO, R.; PEÑA, A. I.; RODRÍGUEZ, A.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. **Theriogenology**, v. 72, n. 6, p. 860-868, 2009.

NAKAMURA, T. J.; MORIYA, T.; INOUE, S.; SHIMAZOE, T.; WATANABE, S.; EBIHARA, S.; SHINOHARA, K. Estrogen differentially regulates expression of Per1 and Per2 genes between central and peripheral clocks and between reproductive and nonreproductive tissues in female rats. **Journal of neuroscience research**, v. 82, n. 5, p. 622-630, 2005.

NOGUEIRA, E.; SILVA, M. R.; SILVA, J. C. B.; ABREU, U. P. G.; ANACHE, N. A.; SILVA, K. C.; RODRIGUES, W. B. Timed artificial insemination plus heat I: effect of estrus expression scores on pregnancy of cows subjected to progesterone–estradiol-based protocols. **Animal**, v. 13, n. 10, p. 2305-2312, 2019.

OLIVEIRA, L. Z.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.; DOS SANTOS, R. M.; BELETTI, M. E.; DE LIMA, V. F. M. H. Assessment of field fertility

and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. **Livestock Science**, v. 146, n. 1, p. 38-46, 2012.

OZTURK, S.; DEMIR, R. Particular functions of estrogen and progesterone in establishment of uterine receptivity and embryo implantation. **Histology and histopathology**, 2010.

PALACÍN, I.; VICENTE-FIEL, S.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J. L. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. **Small ruminant research**, v. 112, n. 1-3, p. 128-135, 2013.

PERRY, G. A.; PERRY, B. L. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 333-338, 2008.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; LUCY, M. C.; GREEN, J. A.; PARKS, T. E.; MACNEIL, M. D.; GEARY, T. W. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 14, p. 5268-5273, 2005.

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.

PERRY, G. A.; SWANSON, O. L.; LARIMORE, E. L.; PERRY, B. L.; DJIRA, G. D.; CUSHMAN, R. A. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. **Domestic animal endocrinology**, v. 48, p. 15-20, 2014.

PFEIFER, L. F. M.; CASTRO, N. A.; MELO, V. T. O.; NEVES, P. M. A.; CESTARO, J. P.; SCHNEIDER, A. Timed artificial insemination in blocks: a new alternative to improve fertility in lactating beef cows. **Animal reproduction science**, v. 163, p. 89-96, 2015.

PFEIFER, L. F. M.; JÚNIOR, J. S. O.; POTIENS, J. R. Effect of sperm kinematics and size of follicle at ovulation on pregnancy rate after timed AI of beef cows. **Animal reproduction science**, v. 201, p. 55-62, 2019.

PFEIFER, L. F. M.; MOREIRA, E. M.; DA SILVA, G. M.; DE SOUZA, V. L.; NUNES, V. R. R.; DE SOUZA ANDRADE, J.; FERREIRA, R. Effect of estradiol cypionate on estrus expression and pregnancy in timed artificially inseminated beef cows. **Livestock Science**, v. 231, p. 103886, 2020.

PURSLEY, J. R.; KOSOROK, Michael R.; WILTBANK, Milo C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 301-306, 1997.

RICHARDS, J. S.; IRELAND, J. J.; RAO, M. C.; BERNATH, G. A.; MIDGLEY JR, A. R.; REICHERT, L. E. Ovarian follicular development in the rat: hormone receptor regulation by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. **Endocrinology**, v. 99, n. 6, p. 1562-1570, 1976.

RICHARDSON, B. N.; HILL, S. L.; STEVENSON, J. S.; DJIRA, G. D.; PERRY, G. A. Expression of estrus before fixed-time AI affects conception rates and factors that impact expression of estrus and the repeatability of expression of estrus in sequential breeding seasons. **Animal reproduction science**, v. 166, p. 133-140, 2016.

RODRIGUES, W. B.; SILVA, A. S.; SILVA, J. C. B.; ANACHE, N. A.; SILVA, K. C.; CARDOSO, C. J. T.; NOGUEIRA, E. Timed artificial insemination plus heat II: gonadorelin injection in cows with low estrus expression scores increased pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol. **Animal,** v. 13, n. 10, p. 2313-2318, 2019

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, n. 9, p. 2173-2181, 2006.

ROELOFS, J. B.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M.; SOEDE, N. M.; KEMP, B. Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1366-1377, 2005.

ROELOFS, J.; LÓPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R. H. F.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M.; HANZEN, C. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. **Theriogenology,** v. 74, n. 3, p. 327-344, 2010.

RUTLLANT, J.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; LÓPEZ-GATIUS, F. Ultrastructural and rheological properties of bovine vaginal fluid and its relation to sperm motility and fertilization: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 2, p. 79-86, 2005.

SÁ FILHO, M. D.; CRESPILHO, 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, n. 1-4, p. 23-30, 2010.

SÁ FILHO, M. F.; SANTOS, J. E. P.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled Bos indicus cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology,** v. 76, n. 3, p. 455-463, 2011.

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

SAACKE, R. G. Insemination factors related to timed AI in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 70, n. 3, p. 479-484, 2008.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.; JACOMINI, J. O.; MAIO, J. R. G.; BARUSELLI, P. S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in Bos indicus cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510-516, 2012.

SCHEIBE, K. M.; GROMANN, C. Application testing of a new three-dimensional acceleration measuring system with wireless data transfer (WAS) for behavior analysis. **Behavior research methods**, v. 38, n. 3, p. 427-433, 2006.

SCHMIDT, H.; KAMP, G. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. **Reproduction**, v. 128, n. 2, p. 171-179, 2004.

SCOTT, M. A. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. **Animal Reproduction Science,** v. 60, p. 337-348, 2000.

SHOJAEI, H.; KROETSCH, T.; WILDE, R.; BLONDIN, P.; KASTELIC, J. P.; SOLER, C.; COOPER, TG; VALVERDE, A.; YÁNIZ, JL. Afterword to Sperm morphometrics today and tomorrow special issue in Asian Journal of Andrology**. Asian journal of andrology**, v. 18, n. 6, p. 895, 2016.

STANFORD, J. B.; WHITE, G. L.; HATASAKA, H. Timing intercourse to achieve pregnancy: current evidence. **Obstetrics and gynecology,** New York, v. 100, n. 6, p. 1333-1341, 2002.

STAUSS, C. R.; VOTTA, T. J.; SUAREZ, S. S. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. **Biology of reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1280-1285, 1995.

SUAREZ, S. S.; HO, H. C. Hyperactivated motility in sperm. **Reproduction in domestic animals**, v. 38, n. 2, p. 119-124, 2003.

SUAREZ, S. S.; KATZ, D. F.; OVERSTREET, J. W. Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. **Biology of reproduction**, 29(5), 1277-1287, 1983.

SUÁREZ, S. S.; OSMAN, R. A. Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. **Biology of reproduction**, v. 36, n. 5, p. 1191-1198, 1987.

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; DA SILVA RASCADO, T.; MAGALHÃES, L. C. O.; CROCOMO, L. F.; DE LIMA-NETO, J. F.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1211-1220, 2011.

THOMAS, J. M.; POOCK, S. E.; ELLERSIECK, M. R.; SMITH, M. F.; PATTERSON, D. J. Delayed insemination of non-estrous heifers and cows when using conventional semen in timed artificial insemination. **Journal of animal science**, v. 92, n. 9, p. 4189-4197, 2014.

THUNDATHIL, J. C. Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. **Theriogenology,** v.77, p.940-951, 2012.

TRIMBERGER, G. W.; DAVIS, H. P. Conception rate in dairy cattle by artificial insemination at various stages of estrus. 1943.

WARD, F., RIZOS, D., CORRIDAN, D., QUINN, K., BOLAND, M., & LONERGAN, P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 60, n. 1, p. 47-55, 2001.

YANAGIMACHI, R. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. **Reproduction**, v. 18, n. 2, p. 275-286, 1969.

YANAGIMACHI, R. The Physiology of Reproduction Vol. 1, Knobil E and Neill JD. 1994.

YÁNIZ, J. L.; GOSÁLVEZ, J.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; SILVESTRE, M. A.; SANTOLARIA, P. Effect of diluent composition on the dynamics of sperm DNA fragmentation and other sperm quality parameters in ram during incubation at 37° C. **Small Ruminant Research**, v. 129, p. 92-96, 2015b.

YÁNIZ, J. L.; PALACÍN, I.; VICENTE-FIEL, S.; SÁNCHEZ-NADAL, J. A.;

SANTOLARIA, P. Sperm population structure in high and low field fertility rams. **Animal reproduction science**, v. 156, p. 128-134, 2015a.

ZHUANG, L; ADASHI, E. Y.; HSUEH, A. J. W. Direct enhancement of gonadotropin-stimulated ovarian estrogen biosynthesis by estrogen and clomiphene citrate. **Endocrinology**, v. 110, n. 6, p. 2219-2221, 1982.