

GUILHERME ARRUDA CEZAR

**CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS CINÉTICOS DO SÊMEN E PRODUÇÃO
IN VITRO DE EMBRIÕES EM BOVINOS DA RAÇA GIROLANDO**

RECIFE

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

GUILHERME ARRUDA CEZAR

**CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS CINÉTICOS DO SÊMEN E PRODUÇÃO
IN VITRO DE EMBRIÕES EM BOVINOS DA RAÇA GIROLANDO**

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. André Mariano Batista

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Aurea Wischral

**RECIFE
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C425c Cezar, Guilherme Arruda
Correlação entre Parâmetros Cinéticos do Sêmen e Produção in vitro de Embriões em Bovinos da Raça Girolando /
Guilherme Arruda Cezar. - 2020.
47 f. : il.
- Orientador: Andre Mariano Batista.
Coorientadora: Aurea Wischral.
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, Recife, 2020.
1. CASA. 2. Componentes principais. 3. Blastocistos. I. Batista, Andre Mariano, orient. II. Wischral, Aurea,
coorient. III. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS CINÉTICOS DO SÊMEN E PRODUÇÃO
***IN VITRO* DE EMBRIÕES EM BOVINOS DA RAÇA GIROLANDO**

Dissertação de mestrado elaborada por

Guilherme Arruda Cezar

Aprovada em 13 de Outubro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Mariano Batista
Orientador - Departamento de Medicina Veterinária-UFRPE

Prof. Dr. Diogo Manoel Farias da Silva
Centro Universitário Maurício de Nassau - UNINASSAU

Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu
Departamento de Medicina Veterinária-UFRPE

DEDICATÓRIA

*Gostaria de dedicar essa dissertação a minha família
que sempre me apoiou nessa caminhada, acreditando
sempre nos meus sonhos.*

“Nessa estrada não nos cabe conhecer ou ver o que virá; O fim dela ninguém sabe bem ao certo aonde vai dar”.

Toquinho

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a toda minha família, em especial minha mãe, Lillian, e meu pai, René, que sempre me apoiaram na minha caminhada, sempre ao meu lado respeitando todas as minhas escolhas e me deram todo apoio para eu ser a pessoa que sou hoje. Gostaria de agradecer a minha esposa, Amanda, que é uma mulher fantástica que me dá forças para continuar sempre sonhando para alcançar meus objetivos. Gostaria de agradecer a toda equipe da Universidade Federal Rural de Pernambuco, professores, funcionários, alunos, em especial, meus orientadores, professora Aurea Wishcral e Professor André Mariano pelo aprendizado durante essa trajetória e pela orientação, a Joana Amélia que foi minha colega de experimento na Fazenda experimental do IPA em Arcoverde, e toda equipe do departamento de reprodução animal. Gostaria de agradecer a toda equipe do Instituto de Pesquisa Agrônômico, em especial a Antônio Santana e Júlio Vieira que sempre me ajudaram a realizar meus experimentos e me ensinaram muito sobre o gerenciamento de uma fazenda de leite. Hoje só tenho a agradecer por está cumprindo esse objetivo que sempre sonhei.

APOIO FINANCEIRO

Coordenador de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1- Reconstrução da trajetória do espermatozoide feito pelo software, utilizando o centro da cabeça como referência traçando uma linha de trajetória.....23

Artigo - Correlation between sperm kinetics and *in vitro* fertilization potential of girolando bulls

Table 1 - *In vitro* embryo production (IVEP).....36

Table 2 - Correlation ($r=$) between sperm kinetics parameters and IVEP results.....38

Table 3- Eigenvalues of covariance matrix of grouped variables and proportion of database analysis.....39

Table 4 – Eigenvectors of covariance matrix demonstrating correlation values for variables (PC) and sperm parameters under analysis.....40

LISTA DE ABREVIACOES

AMPc – Adenosina monofosfato cclico

APC- Análise de componentes principais

CASA- *Computer-aided sperm analysis system*

CIV – Cultivo *in vitro*

COC's – Complexos cumulus-oócitos

CP- Componentes Principais

GV – Vesícula germinativa

IA – Inseminaco Artificial

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II

MIV – Maturaco *in vitro*

PBS – Tampão fosfato salino

PIVE – Producco *in vitro* de embriões

PVP - Polivinilpirrolidona

SFB – Soro Fetal Bovino

SOF – *Synthetic Oviductal Fluid*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específico.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Produção animal e melhoramento genético	15
3.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	16
3.3 CASA (<i>computer-aided sperm analysis system</i>).....	22
3.4 Análise de componentes principais (ACP).....	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
5. ARTIGO.....	30

RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores de bovinos do mundo, possuindo um rebanho de aproximadamente 213 milhões de cabeças distribuídos por todo seu território. A raça Girolando destaca-se no rebanho leiteiro, devido a sua rusticidade e fácil adaptação ao clima tropical, sendo a raça responsável pela maior porcentagem da produção de leite nacional. Para alcançar tal desempenho, a pecuária foi aprimorada ao longo das décadas com a implementação de tecnologia no campo e programas de melhoramento genético de rebanho. As biotécnicas reprodutivas, dentre elas a produção *in vitro* de embriões (PIVE), vem contribuindo para esse processo, oferecendo produção laboratorial segura e acelerando o processo de melhoramento genético. Para aprimorar as taxas de produção embrionárias e analisar parâmetros relacionados à fertilidade, *softwares* vêm sendo utilizados com intuito de melhorar a capacidade de prever o potencial reprodutivo das amostras de sêmen. O *computer-aided sperm analysis system* (CASA) auxilia no exame andrológico e fornece informações relevantes sobre os parâmetros cinéticos do sêmen como motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), índice de oscilação (WOB), velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), velocidade média da trajetória (VAP), amplitude lateral da cabeça (ALH) e frequência de batimento flagelar (BCF). Esses parâmetros auxiliam na análise clínica do sêmen podendo validar uma amostra para utilização em técnicas de reprodução assistida. Entretanto, esses parâmetros, em conjunto, podem apresentar correlação com taxas de fertilidade e produção de embriões. A análise de componentes principais é um método estatístico multivariado que transforma variáveis estudadas em componentes, compactando grande quantidade de dados em poucos componentes, facilitando a análise e correlacionando os componentes adquiridos com um evento estudado. Nesta pesquisa, amostras de sêmen congelado de cinco touros foram utilizadas para produção de embriões *in vitro*, avaliando taxas de clivagem e blastocistos. Posteriormente, três doses de sêmen de cada touro (mesma partida utilizada na fertilização) foram analisadas no CASA. A média dos parâmetros analisados de cada touro foi correlacionada com as taxas de clivagem e blastocisto usando análise de componentes principais. Nesta análise, o primeiro componente (PC1 – 70%) demonstrou que a velocidade curvilínea (VCL) e a velocidade média do percurso (VAP) possuem maior correlação com a PIV de embriões.

Palavras-chave: CASA, componentes principais, blastocistos.

ABSTRACT

Brazil is one of the largest cattle producers in the world, with a herd of approximately 213 million heads distributed throughout the national territory. The Girolando breed stands out in the dairy herd due to its rusticity and easy adaptation to the tropical climate, being the breed responsible for the higher percentage of national milk production. In order to achieve this performance, national livestock farming has been improved over the decades with the application of technology in the field and genetic improvement programs. Reproductive biotechniques, including the *in vitro* embryo production (IVEP), contributed to this process by offering safe laboratory production and accelerating the process of genetic improvement. Thus, softwares have been used to improve herd reproduction rates, such as embryo production rates and sperm analyzed parameters. The computer-aided sperm analysis system (CASA) assists in the andrological examination and provides relevant information about semen kinetic parameters such as progressive motility (PM), linearity (LIN), straightness (STR), wobble (WOB), curvilinear velocity (VCL), straight-line velocity (VSL), average path velocity (VAP), amplitude of lateral head displacement (ALH), and beat-cross frequency (BCF). These parameters assist in the clinical analysis of semen and can validate a sample for use in animal reproduction. However, these parameters together could represent a correlation with fertility rates and embryo production. Principal component analysis is a multivariate statistical method that turns studied variables into components, diminishing a large amount of data into a few components, facilitating analysis and correlating the acquired components with a studied event. In this research, semen samples from five Girolando bulls were used for *in vitro* embryo production; cleavage and blastocyst rates were assessed. Subsequently, three semen samples from each bull (from the same batch used for fertilization) were analyzed using CASA. The averages for the parameters examined for each bull were correlated with cleavage and blastocyst rates using principal component analysis. The first component (PC1 –

70%) demonstrates that curvilinear velocity (VCL) and average path velocity (VAP) had higher correlation with *in vitro* embryo production.

Keywords: CASA, principal components, blastocyst

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de bovinos do mundo, possuindo um rebanho de aproximadamente 213 milhões de cabeças distribuídos por todo território nacional (IBGE, 2018). Nas últimas quatro décadas a pecuária bovina brasileira tinha metade do rebanho e produzia 60% menos da quantidade de carne que é exportada nos dias de hoje. Isso é reflexo dos avanços tecnológicos no manejo dos animais e da implementação das biotécnicas reprodutivas que tornaram possível essa rápida evolução do rebanho, tornando o Brasil o segundo maior exportador de carne bovina (1,9 milhão de toneladas), o segundo maior consumidor (38,6kg/habitante/ano) e o maior produtor de embriões *in vitro* do mundo (NEVES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014; GOMES et al., 2017; CNA, 2020).

Na bovinocultura de leite, o Brasil possui números expressivos de produção, apresentando no ano de 2018, produção de 33,8 bilhões de litros de leite, sendo Pernambuco o estado com a 8º maior produção de leite do país (CILEITE, 2020). A raça Girolando destaca-se no rebanho leiteiro, devido a sua rusticidade e fácil adaptação ao clima tropical, sendo a raça responsável pela maior porcentagem da produção de leite nacional (CANAZA-CAYO et al., 2016). A raça contabiliza mais de 500.000 doses de sêmen vendidas desde a primeira prenhez da raça em 1997 na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (CANAZA-CAYO et al., 2016; GOMES et al., 2017).

Dentre as biotécnicas aplicadas à reprodução, destacam-se as quatro gerações: Inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE), produção *in vitro* de embriões (PIVE) e clonagem/transgênicos. As três primeiras são bem utilizadas no Brasil, apesar de apresentar variações no uso e aplicação entre os estados brasileiros (NEVES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014). Vários são os fatores que limitam a implantação e o uso de biotécnicas reprodutivas. Na PIVE, por exemplo, a estrutura adequada para produção e manipulação dos embriões e sincronização errônea dos animais pode afetar os índices reprodutivos da propriedade (VILELA et al., 2016).

Outro fator determinante na PIVE é o sêmen utilizado; a taxa de fecundação na reprodução *in vivo*, utilizando sêmen congelado, nem sempre é replicada na produção *in vitro*, pois há fatores no laboratório como meio de cultivo, técnica de seleção

espermática e ambiente de incubação que interferem nos padrões de fertilidade (KRISHER, 2013). Estudos de fatores que possam prever a fertilidade de um determinado touro em relação a sua taxa de fertilização de oócitos facilitaria a escolha de touros para serem utilizados em programas reprodutivos, diminuindo o custo de perdas por vacas não gestantes após fertilização.

Neste contexto, *softwares* de análise de sêmen como o *Computer-aided sperm analysis system* (CASA), são frequentemente utilizados para estabelecer análise precisa e padronizada de amostras de sêmen (MORTIMER et al., 2015). Ao longo das últimas duas décadas, as análises dos parâmetros de cinética espermática vêm sendo utilizadas no intuito de correlacioná-los com taxas de clivagem e produção de blastocistos, entretanto, resultados discrepantes *in vitro* quanto *in vivo* são relatados (GLIOZZI et al., 2017; MORREL et al., 2017).

Estas variações nos resultados de estudos prévios justificam os recorrentes estudos na área visando aprimorar sua efetividade. A padronização dessas análises e utilização para previsão da fertilidade potencial de touros pode gerar economias no processo de escolha do reprodutor adequado para um determinado rebanho, aumentando as taxas de gestação de uma propriedade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a correlação entre parâmetros cinéticos do sêmen e as taxas de clivagem e blastocistos produzidos *in vitro* de bovinos da raça Girolando.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os parâmetros cinéticos do sêmen pós-descongelamento de touros da raça Girolando;
- Correlacionar os parâmetros cinéticos do sêmen com as taxas de clivagem e blastocisto produzidos *in vitro* utilizando a análise de componentes principais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção animal e melhoramento genético

O agronegócio brasileiro ao longo dos anos se mantém protagonista na economia do país, movimentando números que auxiliam o país a se manter entre os maiores produtores de carne do mundo (CNA, 2020). Em 2019 a soma de bens e serviços gerados pelo agronegócio somou 1,55 trilhões de reais, representando 21,4% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro. Desse montante, a pecuária representa 32%, ficando atrás apenas da produção de commodities somados (soja, milho, açúcar...) movimentando 494,8 bilhões de reais (CNA, 2020).

A pecuária leiteira tem uma parcela elevada dessa movimentação financeira, Apesar da dificuldade de saber o número exato devido à porcentagem de leite não inspecionado vendido no mercado interno (CINLEITE, 2020). Entretanto, apenas pela movimentação do leite inspecionado o Brasil movimentou mais de 100 bilhões de reais, mas ainda longe do ideal, pois na balança comercial, o Brasil tem um saldo negativo por importar mais produtos lácteos em comparação com sua produção nacional (CINLEITE, 2020).

Para alcançar tal desempenho, a pecuária nacional foi aprimorada ao longo das décadas com aplicação de tecnologia no campo e programas de melhoramento genético de rebanhos. Os grandes programas de melhoramento genético começaram com a importação do gado zebu para o Brasil no início do século XX (BARBOSA, 2005). Em seguida, foi identificado que os índices de produção precisavam ser aprimorados, sendo iniciado o cruzamento do gado europeu (*Bos taurus*), reconhecido pelo bom desempenho produtivo, com o gado indiano (*Bos indicus*) que possuía a rusticidade necessária para se adaptar ao clima tropical do país (MILLER, 2010).

Um exemplo desse cruzamento é a raça Girolando (Gir x Holandês), ao qual o cruzamento mantém a rusticidade da raça Gyr e as altas produções de leite da raça Holandesa (SILVA et al., 2020). Desde então, programas de melhoramento vêm sendo implementados como o *Gene-Plus*, realizado pela Embrapa gado de corte, com objetivo de melhor selecionar os reprodutores através de software especializado, ajudando os criadores a selecionar os melhores animais para alcançar rebanhos de excelência (ROSA et al., 2013). O programa de melhoramento genético da raça Girolando também é

destaque no âmbito nacional, tornando a raça responsável por 70% da produção de leite do país (SILVA et al., 2020).

As biotécnicas reprodutivas tem papel importante nesse processo de melhoramento genético. O Brasil é o maior produtor de embriões *in vitro* do mundo, entretanto, essa marca contrasta com números, tais como, apenas 15% do rebanho utiliza a técnica de inseminação artificial (OLIVEIRA et al., 2014). Tendo em vista esses números, é possível identificar o potencial não explorado da utilização de biotécnicas reprodutivas no país, podendo haver aumento nos números produtivos do agronegócio se houver uma transferência eficiente de tecnologia para o campo.

Entre essas tecnologias, a produção *in vitro* de embriões pode ser uma saída para produção de embriões de qualidade, em laboratório, para posterior implantação no campo, pois a utilização dessa técnica possibilita a coleta de oócitos de uma fêmea geneticamente superior, com posterior fertilização em laboratório, produzindo embriões de uma mesma fêmea para implantação em vacas receptoras, acelerando o melhoramento genético do rebanho devido ao menor intervalo para os procedimentos e a possibilidade de utilização de fêmeas pré-púberes (VILELA et al., 2016).

3.2 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A produção *in vitro* de embriões ocorre em quatro etapas: a aspiração folicular (material de abatedouro ou *in vivo*), maturação oocitária, fertilização e cultivo. Cada etapa possui suas particularidades que serão descritas a seguir.

3.2.1 Aspiração folicular

Para pesquisas científicas, na PIVE, geralmente trabalha-se com oócitos provenientes de ovários coletados de abatedouro, entretanto, há propriedades que trabalham com aspiração folicular guiada por ultrassom para otimizar o manejo reprodutivo do rebanho (MERMILLOD et al., 1992; VIERA et al., 2014).

Os ovários oriundos de abatedouros, logo após os animais serem abatidos, são transportados até o laboratório de maneira breve para manter a viabilidade dos gametas. A temperatura do transporte varia entre 4 a 37°C sendo os melhores resultados

alcançados com a temperatura de 37 °C, pois assemelha-se à temperatura ovariana no organismo da fêmea, conseguindo manter a viabilidade por cerca de 4 horas sem perdas consideráveis (MERMILLOD et al., 1992).

O diâmetro do folículo aspirado é um parâmetro utilizado para escolher qual folículo aspirar, devido a pesquisas que comprovam a competência oocitária e a eficiência nas taxas de fertilização de oócitos aspirados baseado no tamanho folicular (MERMILLOD et al., 1992). Estudos de Mermillod et al. (1992) concluíram que oócitos provenientes de folículos com diâmetros entre 2 e 4 mm são os ideais para aspirar, com maior taxa de oócitos com camadas compactadas de células do cumulus e citoplasma homogêneo. Normalmente, oócitos provenientes de folículos pequenos, com diâmetro menor que 2 mm, não possuem o estoque de RNAm suficiente, impossibilitando seu possível desenvolvimento após fertilização (LONERGAN e FAIR, 2016). Por outro lado, folículos grandes, com diâmetros maiores que 8 mm tendem a possuir oócitos já maturados, entrando já na fase de atresia, logo não são viáveis para fertilização *in vitro* (PARRISH, 2014).

A aspiração folicular guiada por ultrassom (*Ovum pick-up*) é uma alternativa à coleta de oócitos a partir de ovários obtidos em abatedouro. Para execução da técnica necessita-se um dispositivo associado à *probe* de ultrassom, com uma agulha acoplada, que aspira os oócitos por sistema de vácuo até um recipiente com solução salina suplementada (QI et al., 2013). Vários autores reportam resultados positivos com essa técnica, pois a qualidade dos oócitos é melhor, além de ser possível padronizar a coleta com o auxílio de protocolos de superovulação, tendo acesso à maior quantidade de oócitos periodicamente (DE ROOVER et al., 2005; QI et al., 2013; VIERA et al., 2014).

A realização bem-sucedida da técnica depende de fatores como nutrição do animal, habilidade do executor da técnica e o período de coleta, sendo o ideal em fase de crescimento folicular, evitando folículos pequenos (possíveis oócitos incompetentes), folículos pré-ovulatórios (oócito já em MII) ou folículos entrando em atresia (QI et al., 2013; VIERA et al., 2014).

3.2.2 *Maturação in vitro* (MIV)

A maturação oocitária é um evento fisiológico necessário para uma boa fertilização, e conseqüentemente, obter alta taxa de desenvolvimento embrionário. Os oócitos da maioria dos mamíferos iniciam as primeiras fases da meiose durante a vida fetal, ocorrendo o primeiro bloqueio da meiose durante a fase diplóteno da prófase I (vesícula germinativa) (LONERGAN e FAIR, 2016).

O retorno da meiose ocorre *in vivo*, após o pico do hormônio luteinizante (LH) alcançado periodicamente em fêmeas cíclicas. A sinalização intracelular para o retorno da meiose é proveniente da concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Em altas concentrações o AMPc mantém o bloqueio, entretanto com a ação da fosfodiesterase, os níveis desse composto diminuem, permitindo assim o retorno da meiose (JAMNONGJIT e HAMMES, 2005). Após o retorno, o oócito atinge a fase II da meiose (MII) na maturação nuclear, onde há a primeira extrusão do corpúsculo polar, a meiose volta a ser bloqueada até ocorra a fertilização (KRISHER, 2013; LONERGAN e FAIR, 2016).

Essa maturação nuclear ocorre simultaneamente à maturação citoplasmática, onde há redistribuição das organelas, incluindo os grânulos corticais que se estabelecem na periferia da célula, para após a fertilização enrijecerem a zona pelúcida, impossibilitando a polispermia (LONERGAN e FAIR, 2016). As mitocôndrias concentram-se próximas ao núcleo, devido a demanda de energia necessária para os RNAm responsáveis pela síntese proteica no interior da organela. Esses eventos tornam o oócito apto a ser fertilizado, tendo os atributos necessários para tornar-se um embrião viável (KRISHER, 2013).

Na MIV é necessário simular todas as etapas que ocorrem *in vivo* no animal. Os meios utilizados têm a função de simular o acesso a substâncias semelhantes ao ambiente folicular, sendo assim, possuem diversas formulações, tendo como componentes principais as gonadotrofinas, fatores de crescimento, antioxidantes e soro fetal bovino, suplementados no TCM 199 (*Tissue culture medium*) (DO et al., 2016; HANSEN, 2020). Os oócitos são incubados por cerca de 20-24 horas nesse meio em incubadora de CO₂, com temperatura de 38,5 °C, 5% de CO₂ e 90-95% de umidade atmosférica para atingirem o estágio de MII na espécie bovina (HANSEN, 2020). Ao atingir a maturação citoplasmática e nuclear os oócitos estão aptos a serem fertilizados.

3.2.3 *Fertilização in vitro (FIV)*

O sucesso da PIVE depende de uma boa etapa de fertilização, a qual está condicionada à utilização de meios contendo substâncias capazes de mimetizar a capacitação espermática que ocorre *in vivo*. Capacitação é um evento definido, em sua maioria, pelas modificações estruturais que tornam o espermatozoide apto a fertilizar um oócito, aderindo à zona pelúcida e subsequentemente desencadeando a reação no acrossoma, motilidade hiperativada, e finalmente, capacidade de fusão entre o gameta masculino e feminino (BAILEY, 2010). Esses eventos ocorrem naturalmente na fertilização *in vivo* e conseguem ser mimetizados, com sucesso, na fertilização *in vitro* (FIV) de algumas espécies (VENTURA-JUNCA et al., 2015), dentre elas os bovinos.

Um dos meios de capacitação mais utilizados é o TALP (*buffered Tyrode's albumin lactate and pyruvate*) suplementado com cafeína e heparina, substâncias que combinadas estimulam os espermatozoides para capacitação espermática; além do bicarbonato que possui um efeito tampão que estabiliza o pH do meio e auxilia na permeabilidade da membrana espermática, ajudando no influxo de cálcio (PARRISH et al., 2014). Outro meio como Brackett-Oliphant e substâncias como osteoporina também são utilizados apresentando resultados expressivos na fertilização de oócitos, atingindo taxas de produção de blastocisto em torno de 56,4% (BAILEY, 2015; DO et al., 2016).

A FIV requer processamento do sêmen, pois o mesmo também possui substâncias indesejáveis para a fertilização como células mortas, bactérias e enzimas (PARRISH, 2014). Essa é uma parte chave no processo de FIV, sendo assim, duas técnicas são comumente utilizadas: *swim up* e gradiente Percoll, sendo que a segunda apresenta melhores resultados nas taxas de fertilização (VENTURA-JUNCA et al., 2015).

As duas técnicas possuem abordagens diferentes, mas a mesma finalidade de selecionar os melhores espermatozoides para fertilização. O gradiente Percoll separa as células pela centrifugação e lavagem das mesmas. Separando assim os melhores espermatozoides baseado em sua densidade, eliminando os componentes indesejáveis. Por outro lado, a técnica de *swim up* consiste na deposição de espermatozoides no fundo de um *ependorf* contendo meio de fertilização, onde posteriormente se retira o sobrenadante após uma hora, para centrifugação. Em teoria, a técnica seleciona os

melhores espermatozoides baseado em sua motilidade, capazes de nadar do fundo do tubo buscando a superfície (VOLPES et al., 2016). Após a separação das células, para se ter sucesso na fertilização é necessário calcular a dose fertilizante correta para evitar poliespermia e controlar o ambiente em que os espermatozoides serão incubados no meio de capacitação com os oócitos, deixando-os por 18-20h, a 38,5-39 °C e CO₂ atmosférico a 5% (MERMILLOD et al., 1992).

Visto alguns parâmetros avaliados para fertilização *in vitro*, como a concentração e motilidade espermática, a utilização de preditores de fertilidade seria ideal para otimizar as taxas de fertilização, pois esses e outros fatores importantes para a seleção espermática podem ser analisados previamente. *Softwares* como o *computer-aided sperm analysis system* pode incluir uma análise espermática mais precisa, podendo facilitar o processo de fertilização *in vitro* auxiliando na escolha do sêmen ideal, evitando percalços na etapa subsequente, o cultivo de embriões (MORTIMER, 2015).

3.2.4 Cultivo *in vitro* (CIV)

O cultivo é a etapa final da produção de embriões, nela os possíveis zigotos irão se tornar blastocistos num período em torno de 7-9 dias. A ideia do cultivo é simular o ambiente uterino, desde o oviduto à migração uterina, havendo perda gradativa da dependência embrionária das proteínas transcritas proveniente dos gametas fundidos (2-8 células), até a ativação do genoma embrionário para tornar-se blastocisto (MERMILLOD et al., 1992; KRISHER, 2013).

Através de meios de cultivo preparados em laboratório e com o auxílio da incubadora de CO₂ é possível fazer uma produção de embriões totalmente em laboratório até o estágio de blastocisto em determinadas espécies domésticas, como no caso dos bovinos (SMITH et al., 2012). A incubadora controla o ambiente de desenvolvimento do embrião mantendo variáveis ambientais controladas como umidade, temperatura, ar circulante, pH e osmolaridade do meio (SIMOPOULO et al., 2018). A temperatura e a porcentagem de CO₂ na incubadora precisam ser monitoradas constantemente, sendo em bovinos a atribuição de 38,5-39°C e 5% de CO₂ as mais

adotadas pelos autores, apresentando taxas de 30-40% de produção de blastocistos (MERMILLOD et al., 1994; SIMOPOULOU et al., 2018; LOPES et al., 2019).

Os meios normalmente utilizados são o KSOM, CR1aa e destaque para SOF (*synthetic oviduct fluid*) que continua sendo o mais utilizado na PIVE de bovinos (KOCYIGIT, 2016). O SOF é normalmente suplementado com aminoácidos e soro fetal, porém devido ao ambiente uterino *in vivo* possuir outras substâncias como hormônios, fatores de crescimento e antioxidantes, pesquisadores ao redor do mundo continuam testando suplementações no meio de cultivo visando maiores taxas de blastocistos produzidos (SIMOPOULOU et al., 2018; LOPES et al., 2019). Hosseini et al. (2009) suplementaram o meio de cultivo SOF com β -mercaptoetanol aumentando a taxa de blastocistos de 33% para 40%, melhorando também as taxas de eclosão dos blastocistos.

Entretanto, é preciso ter cuidado na adição de substâncias no meio de cultivo, devido ao número de dias que o material fica na incubadora, a chance de contaminação torna-se maior, por isso, é necessário averiguar todos os parâmetros como umidade, CO₂, temperatura e higiene do material utilizado para não ocorrer contaminações (BIELANSKI, 2007; SIMOPOULOU et al., 2018). A adição de tratamentos com luz UV no ambiente de trabalho, procedimentos de lavagem do embrião e controladores de pH nos meios são algumas das técnicas que podem auxiliar na manutenção de um ambiente favorável para PIVE (BIELANSKI, 2007).

Os tipos de sistema também influenciam no cultivo. Nas últimas décadas o sistema estático foi o mais utilizado de diferentes formas, como uso de microgotas em placas de cultivo; placas com *microwheels* adaptado, para não haver interferência nas gotas de meio de cultivo, evitando espalhar o meio pela placa levando a perda dos embriões no processo; e os *microchannels*, que são microcanais que diminuem a quantidade de meio utilizado e restringem a espaço menor, onde as trocas metabólicas acontecem de maneira favorável (SMITH et al., 2012; KOCYIGIT, 2016).

Entretanto, os sistemas dinâmicos vêm ganhando espaço. Baseado na teoria que o embrião migra por várias partes do útero saindo do oviduto até chegar ao útero propriamente, foram estabelecidos sistemas que mimetizassem esse caminho.

Inclinadores e *shakers* foram adaptados nas incubadoras para simular a movimentação do embrião e os resultados são positivos, com maiores taxas de blastocistos (SMITH et al., 2012; KOCYIGIT, 2016). Os resultados influenciam na implantação embrionária e não somente na produção, o que estabelece uma possível vantagem para o sistema dinâmico em relação ao estático.

3.3 CASA (*computer-aided sperm analysis system*)

Quando o *computer-aided sperm analysis system* (CASA) chegou pela primeira vez em meados dos anos 80, acreditava-se que o *software* iria substituir os andrologistas dos laboratórios de reprodução (MORTIMER, 2000). As expectativas não foram atendidas quanto à substituição dos andrologistas, mas o CASA tornou-se uma ferramenta primordial para análises espermáticas, principalmente em pesquisas na área. Estudos recentes mostram a importância do CASA nas áreas de citotoxicidade reprodutiva (KWACK; LEE, 2015), análises clínicas (TALARCZYK-DESOLE et al., 2017) e predição de fertilidade (PETRUNKINA et al., 2007; FAIR e LONERGAN, 2018).

Para entender as possíveis aplicações do CASA, é preciso entender seu funcionamento como ferramenta de auxílio na análise espermática. Primeiramente, o sistema digitaliza a imagem vista pelo laboratorista no microscópio. O *software* então identifica os espermatozoides devido ao contraste do campo escuro, ao fundo, com a cabeça do espermatozoide de cor mais clara, mesmo eles em movimento (MORTIMER, 2000). A cabeça do espermatozoide é reconhecida devido ao número de pixels de computador, ao qual existe um padrão baseado na espécie que está sendo analisada. Entretanto, debris celulares podem ser confundidos pelo sistema com espermatozoides, sendo assim, cabe ao laboratorista identificar na imagem digitalizada e indicar ao CASA que aquela partícula não é um espermatozoide (MORTIMER, 2000).

Após as cabeças dos espermatozoides serem identificadas em um campo, o sistema computa os movimentos seguintes como uma captura contínua, lembrando uma gravação de um filme (Figura 1). De acordo com Mortimer (2000), o raio de movimentação do espermatozoide é calculado a partir dessa captura consecutiva, onde são estabelecidas coordenadas (x,y) no campo selecionado, calculando o tempo de

trajetória desse espermatozoide em uma trajetória determinada. Dentre os parâmetros analisados, destacam-se motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), índice de oscilação (WOB), velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), velocidade média da trajetória (VAP), amplitude lateral da cabeça (ALH) e frequência de batimento (BCF).

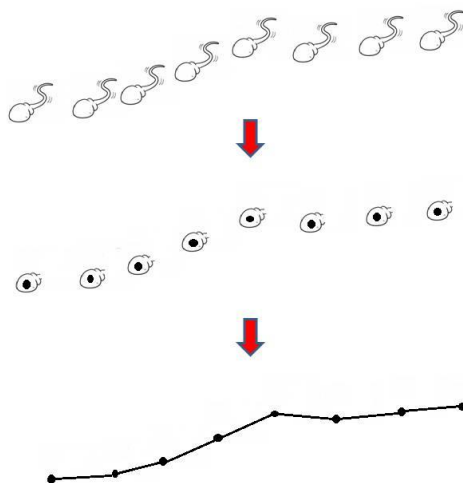


Figura 1. Reconstrução da trajetória do espermatozoide feito pelo *software*, utilizando o centro da cabeça como referência traçando uma linha de trajetória (MORTIMER, 2000).

Ao longo dos anos a ferramenta CASA vem sendo aprimorada, demonstrando um futuro promissor devido a esse aperfeiçoamento. O *Sperm Class Analyzer* vem passando por atualizações ao longo dos anos tornando possível a análise de mais de 60 espécies de mamíferos e peixes (MORTIMER, 2015). O número de telas capturadas para análise simulando a trajetória do espermatozoide foi aprimorado possibilitando análise de obstáculos e identificação de células com reconhecimento de espécie baseado no diâmetro da cabeça e tamanho da calda (MORTIMER, 2015).

Em adição, Alquézar-Baeta et al. (2019) apresentaram uma atualização do CASA de livre acesso, o *OpenCASA*, que permite o acesso a quatro módulos de análise: motilidade, viabilidade, morfologia e resposta espermática ao mecanismo de orientação. Essas ferramentas validam os resultados entre si formando um relatório completo da análise espermática.

Apesar de vários autores registrarem a utilização de parâmetros espermáticos como possíveis preditores de fertilidade, mais estudos precisam ser realizados para identificar um padrão para espécies e raças (COLENBRANDER et al., 2003; COJKIC et al., 2017; GLIOZZI et al., 2017; MORREL et al., 2017). Os resultados de Gliozzi et al. (2017) sugerem que as características espermáticas como motilidade e integridade da cromatina são relevantes para prever fertilidade, principalmente se o possível zigoto irá se desenvolver nos primeiros estágios embrionários em estudos *in vivo*. Cojvic et al. (2017) relataram que motilidade espermática, motilidade progressiva e a velocidade espermática têm influência na fertilização *in vivo* utilizando análises cinéticas e citometria de fluxo.

Entretanto, outros autores afirmam que os parâmetros espermáticos não podem ser utilizados como preditores de fertilidade, pois há muitos fatores biológicos relacionados à fêmea que afetam a taxa de fertilidade como a nutrição, ambiente uterino, qualidade do oócito dentre outros, precisando estabelecer assim, uma análise conjunta, e não apenas uma análise linear entre parâmetros espermáticos e taxa de clivagem/blastocisto (CHRISTENSEN et al., 2005; BROEKHUIJSE et al., 2011).

Uma possível solução para essa discrepância nos resultados seria a utilização da ferramenta estatística análise de componentes principais (APC). Através dessa técnica, as variáveis podem adquirir um peso relacionado à sua importância para um evento analisado, comparando todas as variáveis entre si através da transformação delas em componentes principais (HONGYU et al., 2015). Com auxílio dessa ferramenta seria possível diminuir um conjunto de dados analisados (nutrição, qualidade do oócito, ambiente, parâmetros espermáticos, etc.) estabelecendo maior peso as variáveis mais relacionadas com parâmetros ligados à fertilidade como taxa de clivagem e produção de blastocistos.

3.4 Análise de componentes principais (ACP)

A combinação de variáveis pode representar informação mais valiosa do que utilizá-las de maneira individual para comparar variáveis (BUDAEV, 2010). Essa metodologia de análise de dados demanda um método estatístico específico, visando o agrupamento das variáveis em componentes menores. A análise de componentes principais (ACP) encaixa-se nesse perfil, sendo um método de estatística multivariado que transforma um número grande de variáveis em componentes principais (CP), indicando qual das variáveis comparada entre todas elas apresentam peso maior no evento estudado (HONGYU et al., 2015).

O método estabelece um conjunto de eixos (ou fatores) perpendiculares entre si, onde cada componente é um autovetor obtido da matriz de correlação linear (ou da matriz de covariância, dependendo das variáveis utilizadas), e o comprimento do eixo é o autovalor dessa mesma matriz, que corresponde ao grau de variação do fator no experimento. Portanto, determinando os autovetores e autovalores dessa matriz obtêm-se um sistema de coordenadas que proporcionam a semelhança das amostras e seu grau de variação ao experimento (HONGYU et al., 2015).

O primeiro fator (ou eixo) da ACP representa o fator de maior grau de variância dos dados. Interpretar uma ACP consiste em definir o que cada novo eixo representa no sentido de fatores ecológicos (HONGYU et al., 2015). A interpretação é facilitada pelo valor dos autovalores, sendo indicada a soma dos dois maiores valores ultrapassarem 70% da variação dos dados, pois facilita a interpretação da análise estatística, com enfoque maior no componente de maior porcentagem, pois representa que as duas maiores variáveis correspondem a mais de 70% dos dados analisados, demonstrando um maior peso dessas variáveis no evento estudado (MARTINEZ et al., 2007).

Apesar de essa análise ser utilizada para métodos específicos, vários autores vêm utilizando esse método para diminuir o número de dados coletados, facilitando a análise. A zootecnia e a veterinária vêm utilizando esse método para análise de produção animal (NÚÑEZ-MARTÍNEZ et al., 2006; PAIVA et al., 2010; MEIRA et al.,

2013) e para análise de comportamento animal (BUDAEV, 2010). Em bovinos, Mello et al. (2019) utilizaram a ACP para selecionar as melhores vacas em relação a produção de leite, período de lactação, intervalos de parto e eficiência reprodutiva, transformando os dados em componentes principais correlacionando-as entre si para selecionar os melhores animais.

Na área da reprodução, Agarwal et al. (2003) transformaram os 9 parâmetros usualmente utilizados (MOT, PM, VCL, VSL, VAP, LIN, ALH, BCF e concentração) em dois componentes principais, utilizando-os para correlacionar com parâmetros de infertilidade em humanos, tornando as amostras clínicas mais fidedignas, comparando componentes principais e não variáveis individuais. Em cães, Núñez-martínez et al. (2006) utilizaram a ACP para reduzir o número de variáveis do CASA e baseado em seus resultados VCL e VSL têm grande influência no potencial de fertilização. A possibilidade da análise ser utilizada para reprodução de bovinos é viável, podendo oferecer uma nova ferramenta clínica no exame andrológico.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R. New semen quality scores developed by component analysis of semen characteristics. **Journal of Andrology**, 24(3): 343-352, 2003.
- ALQUÉZAR-BAETA, C.; GIMENO-MATOS, S.; MIGUEL-JÍMENEZ, S.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J.; PALACÍN, I.; CASAO, A.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, R. OpenCASA: A new open source and scalable tool for sperm quality analysis. **PLOS Computational Biology**, 15(1): 1-18, 2019.
- BAILEY, J. L. Factors Regulating Sperm Capacitation. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, 56(5): 334-348, 2010.
- BARBOSA, P. F. Objetivos e critérios de seleção de bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 34(1): 1-20, 2005.
- BIELANSKI, A. Desinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farms animals. **Theriogenology**, 68: 1-28, 2007.
- BRESSAN, F. F.; FANTINATO-NETO, P.; ANDRADE, G. M.; SANGALLI, J. R.; SAMPAIO, R. V.; SIVEIRA, J. C.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V. Challenges and perspectives to enhance cattle production via *in vitro* techniques: focus on epigenetics and cell-secreted vesicles. **Ciência Rural Santa Maria**, 45(10): 1879-1886, 2015.
- BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B. M. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessment in pig artificial insemination. **Theriogenology**, 76(8): 1473-1486, 2011.

BUDAEV, S. V. Using principal component and factor analysis in animal behavior research: caveats and guidelines. **International Journal of Behavioral Biology**, 116(5): 472-480, 2010.

CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO LEITE. **Leite em números – produção e produtividade**. 2018. Disponível em: < https://www.cileite.com.br/leite_numeros_producao>. Acesso em: 6 de Ago, 2020.

CHISTENSEN, P.; BOELLING, D.; PEDERSEN, K. M.; KORSGAARD, I. R.; JENSEN, J. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate in dairy bulls. **Journal of Andrology**, 26(1): 98-106, 2005.

CHOUDHARY, K. K.; KAVYA, K. M.; SHARMA, R. K. Advances in reproductive biotechnologies. **Veterinary World**, 9(4): 388-395, 2016.

COJKIC, A.; DIMITRIJEVIC, V.; SAVIC, M.; JEREMIC, I.; VUKOVIC, D.; COBANOVIC, N.; OBRADOVIC, S.; PETRUJKIC, B. T. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict in cryopreserved bull semen. **Animal**, 11(11): 1975-1982, 2017.

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A. E. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, 38(4): 305-311, 2003.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. Panorama do Agro. 2020. Disponível em: <<https://www.cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro>>. Acesso em: 21 de Jul, 2020.

DE ROOVER, R.; GENICOT, G.; LEONARD, S.; BOLS, P.; DESSY, F. Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. **Animal Reproduction Science**, 86: 13-25, 2005.

DO, V. H.; WALTON, S.; TAYLOR-ROBINSON, A. W. Improvements to *in vitro* culture media for use in bovine IVF. **Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**, 4(2): 205, 2016.

FAIR, S.; LONERGAN, P. Review: understanding the causes of variation in reproductive wastage among bulls. **Animal**, 12(1): 53-62, 2018.

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

GOMES, R. C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira. **Campo Grande: Embrapa Gado de Corte**, 2017, 4 p. (Nota Técnica). Disponível: <<https://www.embrapa.br/documents/10180/21470602/EvolucaoQualidadePecuaria.pdf/64e8985a-5c7c-b83e-ba2d-168ffaa762ad>>. Acesso em: 20 de Jan, 2020.

HANSEN, P. J. *In vitro* production of bovine embryo. **Department of Animal Science, Florida**. Disponível em: <animal.ifas.ufl.edu/hansen/ivf_whats_news.shtml>. Acesso em: 16, Janeiro de 2020.

HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; OLIVEIRA JUNIOR, G. J. Análise de componentes principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **Engineering and Science**, 5(1): 83-90, 2015.

HOSSINI, S. M.; FOROUZANFAR, M.; HAJIAN, M.; ASGARI, V.; ABEDI, P.; OSTADHOSSEINI, S.; MOULAVI, F.; SAFAHANI LANGRROODI, M.; SADEGHI, H.; BAHRAMIAN, H.; EGHBALSAIED, Sh.; NASR-ESFAHINI, M. H. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important?. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 26(6): 355-364, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Pecuária Nacional**. 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>. Acesso em: 20 de Jan, 2020.

JAMNONGJIT, M.; HAMMES, S. R. Oocyte maturation: The coming of age of a germ cell. **Seminars in Reproduction Medicine**, 23(3): 234-241, 2005.

KOCYIGIT, A. A review of *in vitro* culture systems in bovine reproductive biotechnologies. **Journal of Veterinary Research & Animal Husbandry**, 1(1): 101, 2016.

KRISHER, R. L. *In vivo* and *in vitro* environmental effects on mammalian oocyte quality. **The Annual Review of Animal Bioscience**, 1: 393-417, 2013.

KWACK, S. J.; LEE, B. Comparative cytotoxicity and sperm motility using a computer-aided sperm analysis system (CASA) for isomers of phthalic acid, a common final metabolite of phthalates. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 78(18): 1038-1050, 2015.

LONERGAN, P. e FAIR, T. Maturation of oocytes *in vitro*. **The Annual Review of Animal Bioscience**, 4(1): 255-268, 2016.

LOPES, J. S.; CANHA-GOUVEIA, A.; PARÍS-OLLER, E.; COY, P. Supplementation of bovine follicular fluid during *in vitro* maturation increase oocytes cumulus expansion, blastocyst developmental kinetics, blastocyst cell number. **Theriogenology**, 126: 222-229, 2019.

MEIRA, C. T.; PEREIRA, I. G.; FARAH, M. M.; PIRES, A. V.; GARCIA, D. A.; CRUZ, V. A. R. Seleção de características morfofuncionais de cavalos da raça Mangalarga Marchador por meio de análise de componentes principais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 65(6): 1843-1848, 2013.

MELLO, R. R. C.; SINEDINO, L. D.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B. Principal component and cluster analyses of production and fertility traits in Red Sindhi dairy cattle breed in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, 52: 273-281, 2019.

MERMILLOD, P.; MASSIP, A.; DESSY, F. In vitro Production o cattle embryos: Review and Belgium results. **International Journal of Developmental Biology**, 36: 185-195, 1992.

MILLER, S. Genetic improvement of beef cattle through opportunities in genomics. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39(1): 247-255, 2010.

MORREL, J. M.; NONGBUA, T.; VALEANU, S.; VERDE, I. L.; LUNDSTEDT-ENKEL, K.; EDMAN, A., JOHANNISSON, A. Sperme quality variables as indicators of bull fertility may be breed dependant. **Animal Reproduction Science**, 185: 42-52, 2017.

MORTIMER, S. T.; VAN DER HORST, G.; MORTIMER, D. The future of computer-aided sperm analysis. **Journal of Andrology**, 17: 545-553, 2015.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39: 414-421, 2010.

NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORAN, J. M.; PEÑA, F. J. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulation in canine ejaculates: changes after cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, 41(5): 408-415, 2006.

OLIVEIRA, C. S.; SERAPIÃO, R. V.; QUINTÃO, C. C. R. Biotécnicas da Reprodução em Bovinos. **Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite**, 2014, 56 p. (Documento). Disponível em:

<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/117843/1/Cnppl-2014-DOC-175-Biotecnicas-Repr-Bovinos.pdf>>. Acesso em: 20 de Jan, 2020.

PAIVA, A. L. C.; TEIXEIRA, R. B.; YAMAKI, M.; MENEZES, G. R. O.; LEITE, C. D. S.; TORRES, R. A. Análise de componentes principais em características de produção de aves de postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39(2): 285-288, 2010.

PARRISH, J. J. Bovine *in vitro* fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, 81(1): 67-73, 2014.

PETRUNKINA, A. M.; WABERSKI, D.; GÜNZEL-APEL, A. R.; TÖPFER-PETERSEN, E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. **Reproduction**, 134(1): 3-17, 2007.

QI, M.; YAO, Y.; MA, H.; WANG, J.; ZHAO, X.; LIU, L.; TANG, X.; ZHANG, L.; ZHANG, S.; SUN, F. Transvaginal ultrasound-guided ovum pick up (OPU) in cattle. **Biomimetics Biomaterials and Tissue Engineering**, 18: 118, 2013.

ROSA, A. N.; MARTINS, E. N.; MENEZES, G. R. O.; SILVA, L. O. C. **Melhoramento Genético Aplicado a Gado de Corte: Programa Gene-Plus Embrapa**. Brasília: Embrapa Gado de Corte, 2013.

SILVA, M. V. G. B.; MARTINS, M. F.; GONÇALVES, G. S.; PANETTO, J. C. C.; PAIVA, L. C.; MACHADO, M. A.; FAZA, D. R. L. R.; FERREIRA JUNIOR, E. Programa de melhoramento genético da raça girolando: avaliação genética/genômica das fêmeas. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2020, 70 p. (Documento técnico). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/214055/1/DOC-247-Girolando-Femeas>>. Acesso em: 7 de Ago, 2020.

SIMOPOULOU, M.; SFAKIANOUDIS, K.; RAPANI, A.; GIANNELOU, P.; ANIFANDIS, G.; BOLARIS, S.; PANTOU, A.; LAMBROPOULOU, M.; PAPPAS, A.; DELIGEOROGLOU, E.; PANTOS, K.; KOUTSILIERIS, M. Considerations regarding embryo culture conditions: from media to epigenetics. **In Vivo**, 32: 451-460, 2018.

SMITH, G. D.; TAKAYAMA, S.; SWAIN, J. E. Rethinking *in vitro* embryo culture: New developments in Culture Platforms and Potential to improve assisted reproductive technologies. **Biology of Reproduction**, 86(3): 62, 2012.

SOUZA, J. F.; OLIVEIRA, C. M.; LIENOU, L. L.; CAVALCANTE, T. V.; ALEXANDRINO, E.; SANTOS, R. R.; RODRIGUES, A. P. R.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; DIAS, F. E. F. Vitrification of bovine embryos followed by *in vitro* hatching and expansion. **Zygote**, 26(1): 99-103, 2017.

TALARCZYK-DESOLE, J.; BERGER, A.; TASZAREK-HAUKE, G.; HAUKE, J.; PAWELCZYK, L.; JEDRZEJCZAK, P. Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice?. **Ginekologia Polska**, 88(2): 56-60, 2017.

VENTURA-JUNCÁ, P.; IRARRÁZAVAL, I.; ROLLE, A. J.; GUTIÉRREZ, J. I.; MORENO, R. D.; SANTOS, M. J. *In vitro* fertilization in mammals: epigenetic and developmental alterations. Scientific and biotechnical implications for IVF in humans. **Biological Research**, 48(68), 2015.

VIERA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; CASTRO NETTO, A.; GUERREIRO, B. M.; SILVEIRA, C. R. A.; MOREIRA, R. J. C.; SÁ FILHO, M. F.; BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S.

Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve *in vitro* embryo production in lactating and non-lactating Holstein cow. **Theriogenology**, 82: 318-324, 2014.

VILELA, D.; FERREIRA, R. P.; FERNANDES, E. N.; JUNTOLLI, F. V. Pecuária de leite no Brasil: Cenários e avanços tecnológicos. **Brasília: Embrapa Pecuária Sudeste**, 2016, 438 p. (Manual Técnico). Disponível: <ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164236/1/Pecuarria-de-leite-no-Brasil.pdf>. Acesso em: 6 de ago, 2020.

VOLPES, A.; SAMMARTANO, F.; RIZZARI, S.; GULLO, S.; MARINO, A.; ALLEGRA, A. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during *in vitro* fertilization procedures. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 33(6): 765-770, 2016.

5. ARTIGO

Correlation between sperm kinetics and *in vitro* fertilization potential of Girolando bulls

Correlação entre a cinética espermática e o potencial da fertilização in vitro de touros Girolando

Guilherme Arruda Cezar^{1*}, Antônio Santana Santos Filho², Júlio César Vieira², Bárbara Souza Fantin³, Pábola Santos Nascimento¹, Maria Madalena Pessoa Guerra¹, André Mariano Batista¹, Aurea Wischral¹

1*- Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Campus Recife, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil, 52171-900. E-mail: guilherme.cezar92@gmail.com

2 - Laboratório de Melhoramento Genético e Reprodução Animal, Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Arcoverde-PE, Brasil.

3 - Departamento de Medicina Veterinária, Faculdades Integradas Aparício Carvalho (FIMCA), Porto Velho-RO, Brasil.

Manuscrito publicado: Revista Agrária Acadêmica, v. 3, n. 5, p. 44-53, 2020. doi: 10.32406/v3n52020/44-53/agrariacad

Link com as normas da revista: <https://agrariacad.com/normas-para-publicacao/>

Abstract

The present study evaluated the correlation between semen kinetics parameters analyzed using Computer-assisted Semen Analysis (CASA) and *in vitro* embryo production (IVEP) in Girolando breed bulls. First, semen samples from five Girolando bulls were used for *in vitro* embryo production; cleavage and blastocyst rates were assessed. Subsequently, three semen samples from each bull (from the same batch used for fertilization) were analyzed using CASA. The averages for the parameters examined for each bull were correlated with cleavage and blastocyst rates using principal component analysis. The first component (PC1 – 70%) demonstrates that curvilinear velocity (VCL) and average path velocity (VAP) had higher correlation with *in vitro* embryo production.

Key-words: Andrology, bovine, CASA, reproduction.

Resumo

Objetivou-se avaliar a correlação entre os parâmetros cinéticos do sêmen analisados pelo *Computer-assisted Semen Analysis* (CASA) com a produção *in vitro* (PIV) de embriões na raça Girolando. Inicialmente, Amostras de sêmen congelado de cinco touros foram utilizadas para produção de embriões *in vitro*, avaliando taxas de clivagem e blastocistos. Posteriormente, três doses de sêmen de cada touro (mesma partida utilizada na fertilização) foram analisadas no CASA. A média dos parâmetros analisados de cada touro foi correlacionada com as taxas de clivagem e blastocisto usando análise de componentes principais. Nesta análise, o primeiro componente (PC1 – 70%) demonstrou que a velocidade curvilínea (VCL) e a velocidade média do percurso (VAP) possuem maior correlação com a PIV de embriões.

Palavras-chave: Andrologia, bovino, CASA, Reprodução.

Introduction

The sperm samples that are used in fertilization strongly influence *in vitro* embryo production (IVP) results (MORTIMER, 1997, p.419). The effect in bulls has generally been reported to be a cause of variation in rates of development. The ability to select sperm samples with improved *in vitro* performance based on sperm features would be a useful tool for improving embryo production yields (SIQUEIRA et al., 2018, p.8).

Semen analysis has been used for more than half a century now for estimate the fertilization potential of a semen sample (GRAHAM; MOCÉ, 2005, p.493). Computer-assisted semen analysis (CASA) provides an objective evaluation of sperm motility more rapidly and accurately than traditional methods such as visual observation (MORTIMER, 2000, p.520; NAGY et al., 2015, p.371). The efficiency of CASA enables it to set a standard for semen analysis in laboratories, reducing bias and inaccuracy (EHLERS et al., 2011, p.451; AMAN; WABERISKY, 2014, p.13; MORTIMER et al., 2015, p.546).

Some sperm motility parameters may be predictors of the *in vitro* potential of semen samples (AMAN; WABERISKI, 2014, p.12). Evaluation of these parameters in combination with ultrastructural analysis (GU et al., 2019, p.4-6), genomic analysis (TAYLOR et al., 2018, p.7), and *in vitro* insemination analysis (PUGLISI et al., 2012, p.22) among others, prior to use of cryopreserved/thawed semen in IVP, may help to shed further light on the role of semen in embryo development.

In the present study, groups of *in vitro* matured oocytes were inseminated with five different semen samples from 5/8 Girolando bulls (crossbred; *Bos indicus*, Gyr x *Bos Taurus*, Hollstein) with a view to ascertaining the IVP outcome for each individual sample. The samples then underwent CASA to ascertain the sperm motility parameters for further correlation with embryo production and cleavage rates. In view of the scarcity of data on reproduction in the Girolando breed, and the importance of this breed to Brazilian dairy industry (CANAZA-CAYO et al., 2016, p.113), the present study may help to establish a method for predicting fertilization rates using CASA data,

thereby saving time and money in the selection of bulls for reproduction, enhancing pregnancy rates in cows.

Material and methods

Ethics statement

The present study was approved by the Ethic Committee for Animal Experimentation, CEUA, of Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), under license number: 090/2017.

The culture medium was purchased from the Gene Up biotechnology company (Presidente Prudente-SP-Brazil), unless otherwise stated. The frozen semen from five Girolando bulls was prepared at the SEMBRA[®] company (Barretos-SP-Brazil), in 0,25 ml straws (30 x 10⁶/ml sperm) and was purchased for the experiment. These semen samples were used for *in vitro* embryo production. Three semen samples doses from each bull were also analyzed at the Andrology Laboratory of the Department of Veterinary Medicine, at the Federal Rural University of Pernambuco, making a total of 15 analyses. Semen samples were taken from same batch of bulls in order to minimize differences.

In vitro embryo production (IVEP)

Bovine ovaries were collected from a commercial slaughterhouse immediately after slaughter. These were transported in thermal bottles containing saline solution and antibiotics (0.9% NaCl and 30 mg/mL of gentamicin) at 37 °C to the laboratory. The ovaries were rinsed three times in phosphate-buffered saline solution - PBS (pH 7.0-7.2) and kept in a water bath at 37 °C.

The *cumulus*-oocyte complexes (COCs) were aspirated from antral follicles of 3-5 mm in diameter. The COCs were selected under a stereomicroscope (SMZ-745, Nikon, Tokyo, Japan); according to the number of layers of *cumulus* cells (>3 layers) homogeneity and color of cytoplasm (GONÇALVES et al., 2007). Each group of 15-20 COCs was then allowed to undergo *in vitro* maturation (IVM) in a 100 µL droplet of IVM medium [TCM-199, 0.2 mM sodium pyruvate, 10% FBS , 0,1 mM cysteamine, 10

ng/mL epidermal growth factor (EGF), 20 µg/mL FSH/LH, 1 µg/mL estradiol benzoate (E2)] under mineral oil for 24 hours at 38.5 °C in an incubator (WaterJacketed CO₂ Incubators, Thermo Scientific Forma[®] Series II, USA/CANADA), under 5% CO₂ air and saturation humidity.

Semen straws were thawed in a warm bath (Semen Defrost, WTA/Biodux, São Paulo, Brazil) for *in vitro* fertilization at 36.5 °C for 30 seconds. Samples were subsequently selected on a discontinuous Percoll gradient (45 - 90%) and each group of *in vitro* matured COCs was placed in 30 µl of IVF-TALP medium [Tyrode's solution with albumin, lactate and pyruvate (TALP), supplemented with 50 mg/ml heparin] covered with mineral oil, inseminated with 2x10⁶ sperm/ml and incubated for 18 h under the same conditions used for IVM. At 18 h post-insemination (hpi) the groups of presumptive zygotes (PZs) were transferred to an *in vitro* culture (IVC) in 100 µl of synthetic oviductal fluid (SOF) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and incubated until 168 hpi.

Computer assisted sperm analysis (CASA)

Frozen semen straws from each bull were thawed in a warm bath at 37 C° and incubated for 5 minutes after dilution in a warm Tris buffer (v/v). Aliquots of 5µl were placed on previous warmed slides (37 C°) and covered with coverslips to taking photos using a camera (Basler Vision Technologies A312FC) attached to a phase contrast microscope. A minimum 2000 spermatozoa in five non-consecutive fields were randomly chosen for analysis. The parameters analyzed using Sperm Class Analyzer – SCA[™] software v. 5.1 (Microptics, S.L., Barcelona, Spain) were: progressive motility (PM, %), linearity (LIN, %), straightness (STR, %), wobble (WOB, %), curvilinear velocity (VCL, µm/s), straight line velocity (VSL, µm/s) and average path velocity (VAP, µm/s), amplitude of lateral head (ALH, µm), and beat cross frequently (BCF, Hz). The settings for these parameters were: 50 frames s⁻¹; 20-90 µm² for the head area and VCL > 10 µm/s⁻¹ to classify spermatozoa as motile

Experimental design

Five bulls from the SEMBRA[®] Company (Barretos-SP-BR) provided the semen samples. These were represented by the letter “B” followed by a number (1-5)

representing each bull: B1, B2, B3, B4 and B5. The experiment was conducted in two steps. First, the frozen semen samples were thawed and used to fertilize oocytes (n= 715) acquired from a commercial slaughterhouse. At least three fertilizations were performed for each bull. Then, on day 2 and day 7 after IVF, cleavage and blastocyst rates were observed respectively. In the second step, each semen sample from the same batch of fertilized oocytes underwent CASA in triplicate to analyze the sperm kinetics parameters of each bull (total of 15 analyses). The average of the three results from each bull was correlated with cleavage and blastocyst rates.

Statistical Analysis

The cleavage and blastocyst rates of the bulls were compared with the Kruskal-Wallis Test (P value<0.05 for a significant difference), and CASA data were compared using the Tukey test (P value<0.05). Sperm kinetics parameters were correlated with the cleavage and blastocyst rates of all bulls using the Pearson correlation ($r=\pm 1$, $P<0.05$) and the importance of each sperm kinetics parameter for IVEP outcome was analyzed using principal component analysis (PCA) by way of the PRINCOMP procedure. This generates a set of variables identified by PRIN representing by the overall effect of all nine parameters acquired using CASA analysis. The nine parameters were weighted according to the sum of the original values. The values obtained are represented by the covariance matrix with the eigenvalue as axis' length and the eigenvectors as axis' directions. The statistical analyses were conducted using SAS University (2020).

Results

In vitro embryo production (IVEP)

Individual bulls differed from one another in terms of embryo production. Bulls B2 and B4 had the highest cleavage rates ($P<0.05$) and B1 the lowest ($P<0.05$), with no significant difference among the other bulls. B2 had the highest blastocyst rate ($P<0.05$) and B1 the lowest ($P<0.05$), with no significant difference among the other bulls (Table 1.).

Table 1. *In vitro* embryo production (IVEP)

Bull	Total fertilized oocytes (n)	Cleavage % (n)	Blastocyst % (n)
B1	111	51.35% (57) ^c	10.81% (12) ^c
B2	118	72.03% (85) ^a	44.91% (53) ^a
B3	207	68.11% (141) ^b	29.47% (61) ^b
B4	145	72.41% (105) ^a	33.79% (49) ^b
B5	134	67.16% (90) ^b	30.6% (41) ^b

^{abc} Different letters indicate significant difference (P<0.05)

Correlation between sperm kinetics parameter and cleavage/blastocyst rates

The progressive motility rate, VSL, VAP, WOB and ALH did not exhibit any correlation with cleavage or blastocyst rates in any of the bulls evaluated (Table 3). VCL was positively correlated ($r= 0.99$, $P< 0.05$) with cleavage rate in B2, and LIN showed a negative correlation ($r= -0.99$, $P< 0.05$) with blastocyst rate only in B1. STR had the same negative correlation with cleavage and blastocyst rates in B3 ($r= -0.99$, $P< 0.05$), while BCF showed the same positive correlation with cleavage and blastocyst rates in B4 ($r=0.99$, $P< 0.05$) (Table 2).

Table 2. Correlation ($r=$) between sperm kinetics parameters and IVEP results

		Sperm kinetics parameters								
		VCL ($\mu\text{m}/\text{s}$)	VSL ($\mu\text{m}/\text{s}$)	VAP ($\mu\text{m}/\text{s}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	PM (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
B1	Cleavage rate (%)	0.80	0.53	-0.54	0.96	0.61	0.94	-0.41	-0.36	0.86
	Blastocyst rate (%)	0.67	0.68	-0.69	0.99*	0.75	0.98	-0.23	-0.53	0.75
B2	Cleavage rate (%)	0.99*	0.99	0.97	0.77	0.41	0.11	0.77	0.47	0.55
	Blastocyst rate (%)	-0.45	0.37	-0.66	0.15	0.57	0.80	-0.93	0.52	0.44

B3	Cleavage rate (%)	0.70	0.90	0.95	0.96	-0.99*	0.18	0.93	-0.18	0.57
	Blastocyst rate (%)	0.70	0.90	0.95	0.96	-0.99*	0.18	0.93	-0.18	0.57
B4	Cleavage rate (%)	-0.07	0.46	-0.43	0.84	-0.55	0.92	-0.48	0.90	0.99*
	Blastocyst rate (%)	-0.07	0.46	-0.43	0.84	-0.55	0.92	-0.48	0.90	0.99*
B5	Cleavage rate (%)	-0.78	0.59	-0.60	0.82	0.64	0.83	0.97	-0.88	-0.81
	Blastocyst rate (%)	-0.78	0.59	-0.60	0.82	0.64	0.83	0.97	-0.88	-0.81

* Indicates significant difference (P<0,05); PM: progressive motility, LIN: linearity, STR: straightness and WOB: wobble, VCL: curvilinear velocity, VSL: straight line velocity, VAP: average path velocity, ALH: amplitude of lateral head, BCF: beat cross frequency.

Importance of each sperm kinetics parameter for IVEP outcomes

The eigenvalues that represent the length of the axis' for principal components and the eigenvectors that represent directions of the axis' for principal components were obtained by principal component analysis (Table 3). These values indicate that the first principal component (PC1) represents 70% of the cumulative variation of the data analyzed, while, together with the second component (PC2), it represent up to 97.73%, and with the third component (PC3) 99.80%. This demonstrates the importance of the first three principal components.

Table 3. Eigenvalues of covariance matrix of grouped variables and proportion of database analysis

PC	Eigen-value	Difference	Proportion	Cumulative
1	244,48	149,50	0,70	0,70*
2	94,98	86,30	0,27	0,97*
3	8,68	8,18	0,02	1,00*
4	0,50	0,34	0,00	1,00
5	0,16	0,13	0,00	1,00
6	0,03	0,02	0,00	1,00
7	0,01	0,00	0,00	1,00
8	0,01	0,00	0,00	1,00
9	0,00	0,00	0,00	1,00

*Variables responsible for greater proportion of variability in database analysis. PC= Principal component

Analysis of the first principal component (PC1), representing the general effect of all CASA parameters on cleavage and blastocyst rates, reveals certain predominance of the effects of parameters attributable to those with a higher weighting in the matrix; namely VCL (0.711), VAP (0.304), and VSL (0,073). This indicates the importance of these for IVEP outcome, as PRIN1 represents 70% of cumulative variability (Table 4). With the second principal component (PC2), the greater portion of the effect is produced by VCL (0.36), VSL (0.49), VAP (0.41), LIN (0.46) and STR (0.41) parameters. The third principal component (PC3) was predominantly affected by the WOB (0.66) parameter. Since others components had 0% of cumulative variability they were not considered in the analysis.

Table 4. Eigenvectors of covariance matrix demonstrating correlation values for variables (PC) and sperm parameters under analysis.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
PM	-0.001	0.007	0.004	0.057	-0.031	-0.255	-0.057	-0.577	0.144
VCL	0.712	0.364	-0.111	-0.461	0.259	-0.146	0.206	0.054	0.601
VSL	0.073	0.498	-0.088	0.465	-0.397	-0.329	-0.040	0.458	0.625
VAP	0.304	0.411	0.290	0.345	-0.083	0.433	-0.257	-0.449	0.039
LIN	-0.434	0.462	0.141	-0.371	0.272	-0.210	-0.557	0.045	0.075
STR	-0.365	0.415	-0.636	-0.092	-0.081	0.293	0.363	-0.234	-0.139
WOB	-0.266	0.254	0.662	-0.032	0.116	0.085	0.614	0.073	0.008
ALH	0.049	-0.009	-0.003	-0.170	-0.049	0.688	-0.224	0.407	-0.041
BCF	-0.011	0.020	-0.183	0.519	0.819	0.047	0.011	0.117	0.067

*PM: progressive motility, LIN: linearity, STR: straightness and WOB: wobble, VCL: curvilinear velocity, VSL: straight line velocity, VAP: average path velocity, ALH: amplitude of lateral head, BCF: beat cross frequency.

Discussion

Sperm motility is one of the most important characteristics associated with the ability of spermatozoa to fertilize eggs and is indicative of their viability and structural integrity in numerous species (KATHIRAVAN et al., 2011, p.167; DEL OLMO et al., 2013, p.106; FERRAZ et al., 2014, p.1070). In the present study, even though bulls had a good *in vivo* fertility history according to the SEMBRA[®] company, the IVP results showed significant differences (P<0.05) among the bulls included in this study, underlining the differences between *in vitro* and *in vivo* production. The correlation between semen parameters and cleavage/blastocyst rates may thus help to ascertain why these differences may occur.

Semen parameters showed varying degrees of correlation with IVEP results. In the present study, some parameters correlated negatively (STR), and others positively (LIN and BCF). However, these results were specific to each bull, and do not indicate a general overall common to all the bulls. NAGY et al. (2015, p.374-376) found that VAP is the most useful semen kinetics parameter with clinical importance for the prediction of bull fertility in artificial insemination. HIRANO et al. (2001, p.217) also found that VCL was an important parameter that could predict whether *in vitro* fertilization was successful or not in humans. In this study, VAP did not exhibit a

significant difference ($P>0.05$) between the semen with the highest IVEP results, semen of lowest IVEP results and other groups ($P>0.05$). There was thus no correlation between VAP with IVEP results for any group. These results highlight individual differences among animals in order to correlate *in vitro* embryo production with semen parameters. Based on this analysis, individual bull semen parameter/IVEP correlation could not be able to identify possible fertility predictors (TOLEDO-ALVORADO et al., 2017, p. 8225; MUUTTORANTA et al., 2019, p.8188)

However, the principal component analysis sheds new light on the data, as all the parameters and their results can be combined into components determining the weight of each parameter in IVEP production (HONGYU et al., 2016, p.84). AGARWAL et al. (2003, p.345) have reported results indicating that human semen assessment can be reduced to fewer variables using principal components to analyze fertility based on the CASA outcome. This study showed that VCL, VSL and VAP featured heavily in the covariance matrix in terms of correlation with IVEP production. These results thus underline the importance of sperm velocity in enhancing fertility rates as reported by DEL OLMO et al. (2013, p.106-107) in rams. The results for the second principal component showed the importance of STR and LIN. This was expected, since VSL, VCP and VAP are used to calculate these parameters (MORTIMER et al., 2000, p.519) and may thus also play a role in fertility.

LI et al. (2014, p.79) found a positive correlation between high progressive motility and *in vitro* embryo production in Holstein bulls showing that PM could be a possible predictor. This differs from the findings of our study. The covariance matrix results show a low influence of PM on cleavage and blastocyst rates, when all principal components are analyzed. Even in individual bulls, PM exhibit great variability, with negative correlation in some bulls (B1 and B4) and moderate correlation in others (B2- $r< 0.90$). This underlines the differences among breeds and the influence of other factors, such as seminal plasma components and concentration of ejaculate (LI et al., 2014, p. 78). The correlations between cleavage and blastocyst rates and sperm parameters were similar in all bulls. These results were not expected by the authors since blastocyst rates had more influence on oocyte maturation (cytoplasmic and

nuclear) making them more dependent on oocyte quality than cleavage rate (LONERGAN; FAIR, 2015, p. 258).

Various authors have used genomic traits and flow cytometry to predict fertility in females, including sperm analysis, but the results do not suggest that these are good predictive tools in mammals (AMANN; DEJARNETTE, 2012, p.811; OKANO et al., 2019, p. 609). The female tract may select the numbers of spermatozoa and this does not appear in analysis. Other variables may also affect the fertility rate including the nutritional status of females, the technician who performed the AI, and environmental factors (CHRISTENSEN et al., 2005, p.104; BROEKHUIJSE et al., 2011, p.1480-1481). In principal component analysis, however, factors such as nutrition and the environment may be transformed into linear variables correlated with semen parameters components, producing a covariance matrix indicating their importance for fertility rates. It is therefore suggested that further studies must be conducted to apply this methodology to *in vivo* fertility.

Conclusion

Analysis of sperm kinetics parameters as predictors of the *in vitro* potential of semen samples using Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) is an interesting tool that may shed further light on the role of sperm in *in vitro* embryo development. VCL, VSL and VAP, which are regarded as principal components may be able to predict *in vitro* embryo production potential (PC1- 70%), followed by LIN and STR, regarded as secondary principal components (PC2- 27%).

References

AGARWAL, A.; SHARMA, R.K.; NELSON, D.R. New semen quality scores developed by component analysis of semen characteristics. **Journal of Andrology**, v.24, n.3, p.343-352, 2003.

AMANN, R.P.; DEJARNETTE, J.M. Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: A paradigm shift. **Theriogenology**, v.15, n.5, p.795-817, 2012.

AMANN, R.P.; WABERSKI, D. Computer-assited sperme analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v.1, n.1, p.5-17, 2014.

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

CANAZA-CAYO, A. W.; COBUCI, J.A.; LOPES, P.S.; TORRES, R.A.; MARTINS, M.F.; DALTRO, D.S.; SILVA, M.V.G.B. Genetic trend estimates for milk yield production and fertility traits of the Girolando cattle in Brazil. **Livestock Science**, v.109, n.1, p.113-122, 2016.

CHRISTENSEN, P.; BOELLING, D.; PEDERSEN, K.M.; KORSGAARD, I.R.; JENSEN, J. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate in dairy bulls. **Journal of Andrology**, v.26, n.1, p.98-106, 2005.

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

EHLERS, J.; BEHR, M.; BOLLWEIN, H.; BEYERBACH, M.; WABERSKI, D. Standardization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application. **Theriogenology**, v.76, n.3, p.448-454, 2011.

FERRAZ, M.A.M.M.; MORATÓ, R.; YESTE, M.; ARCARONS, N.; PENA, A.I.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C.O.; MUIÑO, R.; MONGAS, T. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to *in vitro* sperm – oocytes interactions of frozen-thawed semen from Hollstein bulls. **Theriogenology**, v.81, n.8, p.1067-1072, 2014.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.212-217, 2007.

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

GU, N.; ZHAO, W.; WANG, G.; SUN, F. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.17, n.66, p.1-12, 2019.

HIRANO, Y.; SHIBAHARA, H.; OBARA, H.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, S.; YAMAGUCHI, C.; TSUNODA, H.; SATO, I. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis and fertilization rates *in vitro*. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.18, n.4, p.213-218, 2001.

HONGYU, G.; SANDANIELO, V.L.M.; OLIVEIRA JUNIOR, G.J. Análise de componentes principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **Engineering and Science**, v.5, n.1, p. 83-90, 2016.

- 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.
- LI, Y.; KALO, D.; ZERON, Y.; ROTH, Z. Progressive motility – a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovine. **Zygote**, v.24, n.1, p.70-82, 2014.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes *in vitro*. **Annual Reviews Animal Bioscience**, v.4, n.1, p.255-268, 2015.
- MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v.3, n.5, p.403-439, 1997.
- MORTIMER, S.T. CASA - practical aspects. **Journal of Andrology**, v.21, n.4, p.515-524, 2000.
- MORTIMER, S.T.; VAN DER HORST, G.; MORTIMER, D. The future of computer-aided sperm analysis. **Journal of Andrology**, v.17, n.4, p.545-553, 2015.
- MUUTTORANTA, K.; TYRISEVÄ, A.; MÄNTYSAARI, E.S.; PÖSÖ, J.; AAMAND, G.P. Genetic parameters for female fertility in Nordic Holstein and Red Cattle dairy breeds. **Journal of Dairy Science**, v.102, n.9, p.8184-8196, 2019.
- NAGY, A.; POLICHRONOPOULOS, T.; GASPARDY, A.; SOLTLI, L.; CSEH, S. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameter generated by Computer-Assisted Semen Analysis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.63, n.3, p.370-381, 2015.
- OKANO, D.S.; PENITENTE-FILHO, J.M.; LEÓN, V.E.G.; MAITAN, P.P.; SILVEIRA, C.O.; WADDINGTON, B.; DÍAZ-MIRANDA, E. A.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J.D. *In vitro* evaluation of cryopreserved bovine sperm and its relation to field fertility in fixed-time artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v.54, n.3, p.604-612, 2019.
- PUGLISI, R.; POZZI, A.; FOGGIO, L.; SPANÓ, M.; ELEUTERI, P.; GROLLINO, M.G.; BONGIONI, G.; GALLI, A. The usefulness of combining traditional sperm assessments with *in vitro* heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated *in vivo*. **Animal Reproduction**, v.132, n.1-2, p.17-28, 2012.
- SIQUEIRA, A.F.P.; CASTRO, L.S.; ASSIS, P.M.; BICUDO, L.D.C.; MENDES, C.M.; NICHI, M. Sperm traits on *in vitro* production (IVP) of bovine embryos: Too much of anything is good for nothing. **PLoS One**, v.13, n.7, p.1-16, 2018.
- TAYLOR, J.F.; SCHNABEL, R.D.; SUTOVSKY, P. Indication of genomic variants causing sperm abnormalities and reduced male fertility. **Animal Reproduction**, v.194, n.1, p.57-62, 2018.

TOLEDO-ALVARADO,H.; CECCHINATO, A.; BITTANTE, G. Fertility traits of Holstein, Brown Swiss, Simmental, and Alpine Grey cows are differently affected by herd productivity and milk yield of individual cows. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.10, p.8220-8231, 2017.