



333

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO



**AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DE SÊMEN CONGELADO
E USO DE ÁRVORE DE DECISÃO PARA PREDIÇÃO DE
FERTILIDADE EM IATF DE VACAS ZEBUÍNAS**

FRANCISCO EDUARDO MACHADO VAZ

Campo Grande – MS

2022

FRANCISCO EDUARDO MACHADO VAZ

**AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DE SÊMEN CONGELADO
E USO DE ÁRVORE DE DECISÃO PARA PREDIÇÃO DE
FERTILIDADE EM IATF DE VACAS ZEBUÍNAS**

Orientador: Prof. Dr. Ériklis Nogueira

Coorientadora: Prof. Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
da Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Veterinárias

Campo Grande – MS

2022

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela força que tem me concedido em momentos difíceis. Aos meus familiares, Maria Vitória de Souza Machado e Maurício de Barros Vaz; A minha esposa Tatiane e filhos Maya e Pedro que amo muito; minha fortaleza inexpugnável onde posso descansar sempre que preciso – e sempre preciso. Ao professor Dr. Érikis Nogueira, pela orientação, amizade, paciência e profissionalismo na condução deste nosso trabalho. Aos meus colegas e professores do curso de mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, em especial a Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva, pelas valiosas palavras e ensinamentos que levo comigo para a vida, obrigada pela ajuda incondicional, pelo incentivo, pela amizade e sobre tudo pelas críticas construtivas para me tornar uma melhor profissional; Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo obrigado pela ajuda que foi fundamental para este projeto. A Bianca Rodrigues Acacio e Graziela da Costa Alves Ferreira, obrigado pela amizade e, por compartilhar com vocês esses últimos 2 anos. Ao Fernando Patez, obrigado pela amizade e informações prestadas. Aos pesquisadores da EMBRAPA Gado de Corte e Pantanal; Dra. Juliana Corrêa Borges Silva, Dr. Urbano Gomes Pinto de Abreu e, Dra. Alessandra Corallo Nicacio, obrigado pela ajuda, pelos ensinamentos e apoio sempre que foi preciso. E a técnica MV Ana Paula Sivieiro Leite “Boiadeira” pela amizade e companheirismo. Obrigado a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização do meu sonho.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
Abstract	vii
CAPÍTULO 1	8
1.1 INTRODUÇÃO	8
1.2. OBJETIVOS	11
1.2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	11
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
CAPÍTULO 2	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Breve histórico sobre a inseminação artificial.....	12
2.2 A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de vacas zebuínas	12
2.3 Análises Seminais – Sistema de Análise Computadorizada do Movimento Espermático (CASA) e Citometria de Fluxo	13
2.4 Equações de Predição	15
2.5 Mineração de dados.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Inseminação artificial em tempo fixo.....	18
3.2 Testes laboratoriais: Avaliação da qualidade do sêmen.....	18
3.2 Análise estatística.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÃO	29
6. REFERÊNCIAS	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.	Porcentagem de prenhez a campo e % de predição de prenhez pela equação gerada e o número de inseminação artificial (IA) realizada	22
Tabela 3.	Regras para Probabilidade de prenhez	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Saída da árvore de decisão obtidas pelo software Weka 3.8, por meio do classificador J48	24
Figura 2	Árvore podada para Motilidade Progressiva (ProgCASA) com valor $\leq 24,2\%$	25
Figura 3.	Árvore de decisão podada para Motilidade Progressiva (ProgCASA) com valor $> 27,4\%$.	26

RESUMO

O estudo foi conduzido com objetivo de buscar correlações de análises laboratoriais e taxa de prenhez para predição de fertilidade em IATF de vacas zebuínas. Foram realizados testes laboratoriais com amostras de sêmen de 71

touros das raças Nelore e Angus, utilizadas na IATF de 13.174 vacas Nelore, no estado de Mato Grosso do Sul. Para determinação da qualidade espermática, avaliou-se motilidade e vigor pós-descongelamento, concentração espermática, análise morfológica e teste de termo resistência rápido (TTR). A análise computadorizada para avaliação da cinética espermática foi determinada pelo equipamento *Computer Assisted Semen Analyse* (CASA), modelo *Ivos-Ultimate*, e análise dos parâmetros: motilidade total (%; MT), motilidade progressiva (%; MP), velocidade média ($\mu\text{m/s}$; VAP), velocidade retilínea ($\mu\text{m/s}$; VSL), velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$; VCL), amplitude lateral de cabeça (μm ; ALC), linearidade (%; LIN), retilinearidade (%; STR). Os procedimentos de citometria de fluxo foram realizados utilizando o equipamento *CytoFLEX™* avaliando a integridade de membrana plasmática e avaliação do potencial mitocondrial. Os parâmetros mais significativos para prenhez foram submetidos ao Proc Logistic do SAS, e a equação gerada foi $P/IA = -0,11 + (ECC \times 0,058) - (integra \times 0,004) + (polarizada \times 0,007) + (motcasa \times 0,011) + (vigor \times 0,15) - (defeitos \text{ totais} \times 0,008) - (progcasa \times 0,024) - (vsl \times 0,005)$. Estes parâmetros foram considerados relevantes e submetidos a análise no software Weka 3.8, por meio do classificador J48, produzindo uma árvore de decisão, com os parâmetros mais importantes para predição de prenhez em IATF identificados: Motilidade Progressiva, Motilidade Total e velocidade retilínea (VSL) no CASA, integridade de membrana plasmática, vigor espermático e defeitos totais. A média da taxa de prenhez observada foi igual a calculada pela equação gerada, assim, concluímos que o modelo é multifatorial com situações de compensação que devem ser consideradas nas análises.

Palavras-chave: Inseminação Artificial, Fertilidade, Predição.

ABSTRACT

The study was conducted with the objective of looking for correlations of laboratory analyzes and pregnancy rate for fertility prediction in FTAI of zebu cows. Laboratory tests were carried out with semen samples from 71 Nelore and Angus bulls, used in the FTAI of 13,174 Nelore cows, in the state of Mato Grosso do Sul. To determine sperm quality, post-thawing motility and vigor, sperm

concentration, morphological analysis and rapid thermo-resistance test (TTR) were evaluated. Computerized analysis to evaluate sperm kinetics was determined by the Computer Assisted Semen Analyze (CASA), Ivos-Ultimate model, and analysis of parameters: total motility (%; MT), progressive motility (%; MP), mean velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP), rectilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VSL), curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL), lateral head amplitude (μm ; ALC), linearity (%; LIN), rectilinearity (%; STR). Flow cytometry procedures were performed using the CytoFLEX™ equipment evaluating plasma membrane integrity and mitochondrial potential assessment. The most significant parameters for pregnancy were submitted to the SAS Logistic Proc, and the generated equation was $P/IA = -0.11 + (ECC \times 0.0589) - (\text{integral} \times 0.004) + (\text{polarized} \times 0.0070) + (\text{motcasa} \times 0.0109) + (\text{vigor} \times 0.15) - (\text{total defects} \times 0.0069) - (\text{progcasa} \times 0.024) - (\text{vsl} \times 0.0052)$. Relevant data which are more effective for pregnancy (P/AI), when taken together, were obtained by the Weka 3.8 software, through the J48 classifier, producing a decision tree, with the most important parameters for pregnancy prediction in FTAI identified: Progressive Motility, Total Motility and Rectilinear Velocity (VSL) in CASA, Plasma Membrane Integrity, Sperm Vigor and Total Defects. The average of the observed pregnancy rate was equal to that calculated by the generated equation, thus, we concluded that the model is multifactorial with compensation situations that must be considered in the analyses.

Keyword: artificial insemination, fertility, prediction

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A inseminação em tempo fixo promoveu o crescimento da comercialização de sêmen no Brasil, que se tornou um mercado potencialmente atrativo para bovinos, já que o País possui o maior rebanho comercial do mundo, com 214,7 milhões de cabeças de gado (IBGE, 2019). Com esse desempenho, o Brasil se mantém como o detentor do segundo maior rebanho bovino do mundo e o principal exportador desse tipo de carne. Ainda que a Índia lidere o ranking mundial, com 303,3 milhões de animais, o Brasil tem apresentado um crescimento vertiginoso, correspondente a 11,3% entre 2016 e 2020, demonstrando sua alta capacidade de competitividade (Mapa, 2020).

Em 2019, a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA) relatou um aumento acentuado nas vendas de sêmen bovino. Conforme o relatório, até o mês de setembro de 2018 foram comercializadas 11.450.505 doses; contra 9.701.282 no mesmo período de 2018 (ASBIA, 2021).

A fertilidade bovina é um processo multifatorial, que depende da qualidade do sêmen, da fertilidade das fêmeas, do manejo adequado do rebanho e da realização adequada da técnica de inseminação artificial (IA). Mas é necessária atenção para o fato de que a fêmea tem limitações em relação ao número de descendentes em curto prazo. Na contramão desse limite, os touros são capazes de produzir uma prole quantitativamente superior, números que podem ser potencializados com o emprego de técnicas de fertilização, a exemplo da utilização de IA – o que deixa evidente a alta qualidade do sêmen na fertilidade e, conseqüentemente, na produção de animais de excelente perfil genético (SELLEM, 2015).

No que concerne aos fatores inerentes à fêmea, salientam-se o anestro pós-parto e a baixa condição de escore de condição corporal (ECC) no início dos protocolos. Vacas com baixo ECC apresentaram menor diâmetro folicular na IATF e menores taxas de cio, ovulação e prenhez (Jolly et al. 1995). Por outro lado, a fertilidade de touros tem recebido muito menos consideração (SELLEM, 2015). Payan-Carreira e colaboradores (2013 apud SELLEM, 2015) sugerem, para uma possível resolução do problema, que haja uma determinação rigorosa de preditores, identificando aqueles que realmente tem efetividade no processo de fertilidade dos espermatozoides.

No caso da técnica utilizada na IATF, de acordo com Andersson *et al.*, (2004) e Nogueira *et al.* (2011 a b), é necessário mencionar o fato de que o emprego dessa técnica exerce um significativo impacto às taxas de prenhez, mesmo que haja a preocupação da utilização de sêmen avaliados em testes laboratoriais simples; e que tenham como parâmetros os protocolos mínimos de qualidade. Essa avaliação espermática laboratorial busca avaliar da melhor forma possível a capacidade de fertilidade de um indivíduo, a intenção é elaborar um protocolo confiável cujos aspectos elencados para estabelecer características que possam ser utilizadas como indicadores.

Para os pesquisadores em questão, essa definição por meio dos preditores seria muito proveitosa à indústria que explora o sêmen enquanto um produto estratégico para potencializar a reprodução. Essa maior atenção em relação aos preditores auxiliaria também nas pesquisas que, caso obtivessem sucesso, criariam novas e mais eficientes terapias contra a infertilidade, tanto em homens quanto em animais (PAYAN-CARREIRA *et al.*, 2013 apud SELLEM, 2015).

Outro fator positivo, conforme Salamon e Maxwell (1995) e Ortega *et al.*, (2003) encontra-se na possibilidade de um maior e melhor entendimento a respeito dos efeitos colaterais atualmente constatados sobre a integridade e funcionalidade espermática, no emprego das tecnologias e processamento do sêmen (refrigeração, congelamento e descongelamento); e o processo da sexagem.

As alterações que ocorrem em razão do processo de congelamento e descongelamento são, em sua maioria, biológicas e funcionais, o que prejudica a qualidade do sêmen e, em casos mais graves, inviabiliza sua utilização (ORTEGA *et al.*, 2003). Os danos mais prevalentes em caso de alterações atingem a membrana espermática, reduzindo sua mobilidade e comprometendo, no todo ou em parte, a viabilidade de sua da membrana espermática alterada. Soma-se a esse problema danos futuros referentes a disponibilidades dos gametas durante o sistema reprodutivo da fêmea e durante a fertilização (SALAMON; MAXWELL, 1995; ORTEGA *et al.*, 2003).

Dentre alguns fatores atinentes à qualidade do sêmen utilizado nos programas inseminação artificial (IA), destacam-se os padrões de movimento espermático, integridade de membrana plasmática e dose inseminante praticada (NOGUEIRA *et al.*, 2019). Além disso, a qualidade do sêmen pode variar ao longo da vida de touros e, até touros férteis, podem produzir ejaculados com comprometida capacidade de fertilização, dependendo da sua idade, ambiente, fatores nutricionais e farmacológicos.

No que diz respeito às avaliações espermáticas *in vitro*, sabe-se que apresentam variáveis consideráveis notadamente relativas a testes subjetivos, principalmente sob microscopia óptica e análises proteômicas. Todavia, a motilidade e a morfologia espermática constituem-se como preditores de alta relevância no que diz respeito à fertilidade, além de figurar com um dos métodos com boa eficiência e baixo custo (SHARMA *et al.*, 2012; UTT, 2016).

Apesar de ser considerado um dos mais seguros, senão o mais seguro, modelo para aferir a fertilidade de touros, a taxa de prenhez requer, para alcançar melhores resultados, um tempo maior em relação aos procedimentos; além de ser um método de elevado custo econômico. Uma estratégia mais econômica e de boa resolubilidade é o emprego dos métodos *in vitro*, também bastante úteis para avaliar a fertilidade de reprodutores doadores de sêmen (SHARMA *et al.*, 2012).

É nessa perspectiva que o presente estudo *Avaliação de Sêmen Congelado para Predição de Fertilidade em IATF de Vacas Zebuínas* se insere, buscando – enquanto objetivo geral pesquisa – relações, com novas formas de avaliação estatística, de análises laboratoriais e taxa de prenhez em IATF de vacas zebuínas

2 OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Geral

O estudo foi conduzido com objetivo de validar a equação de predição em IATF de vacas zebuínas, utilizando a metodologia de árvore de decisão com o resultado das correlações de análises laboratoriais e taxa de prenhez.

1.2.2. Objetivos Específicos

Realizar os testes laboratoriais (TTR, CASA, Citometria de fluxo); avaliar os dados de prenhez real com o de prenhez na equação. Tal validação poderá ser uma ferramenta útil para identificar amostras de sêmen com maior fertilidade, ou melhores resultados de prenhez em IATF, trazendo maior economia e sustentabilidade aos sistemas de produção pecuários, pela obtenção de melhores resultados, com menor quantidade de insumos dispendidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve histórico sobre a inseminação artificial

No Brasil, a inseminação artificial foi pioneira, tendo sido a primeira biotecnologia reprodutiva utilizada no país para realizar o melhoramento

genético animal. Desde a década de 1930, quando se iniciou o emprego da técnica no Brasil, que essa biotecnologia tem apresentado avanços cada vez mais vantajosos para aqueles que a utilizam. Grande parte dessas conquistas se deve aos esforços de técnicos de campo e criadores pioneiros, que mesmo face às inúmeras dificuldades que surgiram, conseguiram que a técnica fosse reconhecida e considerada como um dos maiores eventos da produção animal, tornando possível a democratização do uso de reprodutores geneticamente superiores (SEVERO, 2015).

2.2 A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de vacas zebuínas

A IATF é uma técnica reprodutiva cuja dinâmica envolve padrões determinados de controle, nos quais os lotes de fêmeas a serem inseminadas têm dia e horário estabelecidos previamente por meio de protocolos específicos. Os protocolos visam à sincronização da ovulação das matrizes bovinas, utilizando para tanto o emprego de medicação específica segue cronogramas pré-agendados (ASBIA, 2013).

A técnica da IATF é reconhecida como uma das alternativas de melhor desempenho no que diz respeito à superação de problemas relativos ao estro nas fêmeas zebuínas – que têm peculiaridades bastante acentuadas na manifestação de comportamento estral, como demonstrado por Barros e colaboradores (2005). É de vital relevância para a ciência animal o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de tratamento que tenham como objetivo sincronizam o crescimento folicular e a ovulação – estratégias que, como apontam Figueiredo e colaboradores (1997), facultam a realização de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) sem; como lembram Figueiredo e colaboradores (1997) e Pinheiro et al. (1998), a necessidade da detecção do cio.

De acordo com Bó e seus colaboradores (2002) e Baruselli *et al.* (2002), a utilização de protocolos validados para a IATF tem por objetivo a indução de níveis de crescimento folicular de forma inédita, fomentando novas ondas de incremento, além de possibilitar o controle da duração do crescimento folicular até o estágio pré-ovulatório.

Concordando com Inforzato e colaboradores (2008), percebe-se, na utilização do IATF, que a vantagem do emprego desta técnica consiste na possibilidade de se emprenhar um número considerável de animais nos primeiros 10 a 15 dias de estação de monta. Soma-se a essa vantagem mais algumas, como o decréscimo da necessidade da aquisição de touro; possibilidade de cruzamento entre raças, tendo como base os animais selecionados e com as melhores características do mercado; considerável incremento na eficiência reprodutiva; menor tempo no que diz respeito ao intervalo de partos; concentração dos nascimentos em épocas específicas do ano, especialmente às que têm melhores condições (julho, agosto, setembro); ganho de peso ao desmame; padronização do rebanho (INFORZATO *et al.*, 2008).

2.3 Análises Seminais – Sistema de Análise Computadorizada do Movimento Espermático (CASA) e Citometria de Fluxo

A qualidade do sêmen sofre variações ao longo da vida reprodutiva do touro e até mesmo os considerados férteis podem produzir alguns ejaculados com inadequada capacidade fecundante, que pode ser relacionada não somente à idade ou ambiente em que vivem (BRITO *et al.*, 2002). A fertilidade do touro deve ser monitorada por análise laboratorial periódica da qualidade do sêmen e também através de registros de taxa de concepção em programas reprodutivos (SELLEM *et al.*, 2015).

Deve-se considerar a particularidade dos dados fornecidos por cada central, dada a subjetividade de cada avaliador local (THUNDATHIL; DANCE; KASTELIC, 2016). Portanto, torna-se necessário implementar novas avaliações uma vez que as atuais são incapazes de predizer a capacidade fertilizante real dos espermatozoides bovinos.

O sistema de análise computadorizada do movimento espermático ("*Computer Assisted Sperm Analysis*" - CASA) associado aos microscópios ópticos, têm sido aplicados na tentativa de aumentar a eficiência e a objetividade da avaliação convencional do sêmen (VERSTEGEN *et al.*, 2002). O sistema

CASA refere-se a um sistema que digitaliza imagens sucessivas dos espermatozoides e estabelece vários parâmetros da trajetória individual de cada espermatozoide, fornecendo informações rápidas e precisas (FARREL *et al.*, 1998). O sistema analisa o movimento dos espermatozoides e classifica em quatro padrões pré-definidos: móvel não progressivo, linear lento, linear rápido e imóveis (MORTIMER & MAXWELL, 1999).

Os parâmetros gerados da motilidade espermática pelo sistema são: Motilidade Total (%), referente à população de células que estão se movendo com uma velocidade mínima determinada no setup, sendo a proporção de células móveis do total; Motilidade Progressiva (%), refere à porcentagem de células movendo-se progressivamente; Velocidade de Trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; Velocidade Progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto; Velocidade Curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), que é a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula; Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, μm), é a largura média da oscilação da cabeça conforme a célula se move; Frequência de Batimentos (BCF, Hz), é a frequência com que a cabeça do espermatozoide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido; Retilinearidade (STR, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VAP; Linearidade (LIN, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VCL; e Velocidade Rápida (%); (Arruda, 2000).

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

A técnica da Citometria de Fluxo, desenvolvida primeiramente em 1934, consiste em uma análise citológica através de equipamentos modernos que tem seu funcionamento através de laser, o que permite maior precisão nos resultados. É utilizada com frequência para analisar alterações espermáticas e também na sexagem espermática por quantificação do DNA (BRITO *et al.*, 2018).

Essa técnica é vantajosa sobre as outras clássicas para a avaliação da viabilidade e integridade espermática, pois este sistema automatizado tem a

capacidade de examinar milhares de espermatozoides em menos de um minuto, mede a quantidade de uma ou mais sondas fluorescentes associadas às células espermáticas com precisão, sensibilidade, rapidez e em grande quantidade de células. É possível contar e examinar as células em uma solução aquosa, que segue um fluxo linear, onde passam individualmente através de um feixe de luz, que excita os marcadores, ou fluorocromos, associados às células e capta a frequência da luz. O citômetro de fluxo, por sua vez, converte essa frequência em sinais elétricos, que são quantificados por softwares específicos (BERGSTEIN *et al.*, 2014).

Foi desenvolvido nos últimos anos, uma variedade significativa de marcadores moleculares, por exemplo: marcadores de membrana plasmática (CFDA, 6-carboxifluoresceína; IP, iodeto de propídio), de reação acrossomal (FIT-PSA, isotiocianato de fluoresceína associado à aglutinina do *Pisum sativum*, PNA-Fitc, isotiocianato de fluoresceína associado à aglutinina do *Arachis hypogaea*), potencial mitocondrial (JC-1, iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,10,3,30-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina; R123, rodamina 123), e a escolha de um ou outro está associado com o objetivo do estudo. A utilização de sondas fluorescentes permite mensurar a viabilidade espermática, com a avaliação estrutural e funcional dos espermatozoides de forma mais ampla, criteriosa e rápida (BERGSTEIN *et al.*, 2014).

2.4 Equação de Predição

A avaliação espermática laboratorial tem o objetivo de analisar o potencial de reprodutores/partidas de sêmen e estabelecer características confiáveis, que possam ser utilizadas como indicadores de fertilidade. Na rotina laboratorial é realizada avaliações subjetivas de motilidade e concentração de células espermáticas por dose. Entretanto, em um mercado onde se exige cada vez mais informações de predição de fertilidade seminal na IATF tais avaliações podem ser insuficientes. (POTIENS, 2021).

Diversos estudos têm sido conduzidos no sentido de estabelecer a correlação dos testes laboratoriais ou associações com os índices de fertilidade *in vivo* (Freitas-Dell'Aqua *et al.*, 2009). As equações de predição de fertilidade

poderá ser uma ferramenta útil para identificar amostras de sêmen com maior fertilidade, ou melhores resultados de prenhez em IATF.

2.5 Mineração de dados

A Mineração de Dados (Data Mining) é uma nova metodologia para melhorar a qualidade e a eficiência das decisões, por meio da obtenção de conhecimento útil para tomada de decisões estratégicas, baseada nos dados históricos armazenados. Dentre as técnicas de Mineração de Dados utilizadas para classificação, destaca-se a Árvore de Decisão (AD). Trata-se de um método adequado quando o objetivo da Mineração de Dados é a classificação de dados ou predição de saídas. É conveniente usar Árvore de Decisão quando o objetivo for a categorização dos dados. Ela também é uma boa escolha quando o objetivo é gerar regras que podem ser facilmente entendidas, explicadas e traduzidas para linguagem natural.

A técnica de árvore de decisão tem a capacidade preditiva e de resolução de problemas de maneira simples e objetiva, com a vantagem de efetuar o ganho de conhecimento e a tomada de decisão a partir de uma construção de uma árvore com base em uma massa de dados (SHARMA *et al.*, 2013).

O que direciona a tomada de decisão, numa estrutura semelhante a uma árvore. Os modelos em árvore de decisão facilitam a interpretação e a compreensão de suas regras e podem contribuir para a confiança do tomador de decisões em adotá-los como ferramenta de suporte quando da sistematização de adoção de tecnologias.

Uma das vantagens da aplicação deste algoritmo na tomada de decisão é que o mesmo se mostra adequado para os procedimentos, envolvendo as variáveis qualitativas contínuas e discretas presentes nas bases de dados, e o mesmo permite a construção de árvores de decisão que classifica e apresenta em suas ramificações os atributos de maior relevância (VIEIRA *et al.*, 2018).

Após a criação da árvore, o algoritmo aplica técnicas de poda onde vão ser retiradas as “impurezas” da árvore deixando somente as informações importantes e que agregarão para a tomada de decisão (LORENZETT; TELÖCKEN, 2016).

Portanto uma árvore de decisão é constituída de uma cadeia de nós de decisão, conectados por ramificações, estendendo-se desde o nó raiz até os subnós, tendo como requisito básico a existência de um atributo meta (DE ARAÚJO VIEIRA *et al.*, 2018). As árvores de decisão usam vários algoritmos para decidir dividir um nó em dois ou mais subnós. A criação de subnós aumenta a homogeneidade dos subnós resultantes. Em outras palavras, podemos dizer que a pureza do nó aumenta em relação ao atributo meta. A árvore de decisão divide os nós em todas as variáveis disponíveis e então seleciona a divisão que resulta em subnós mais homogêneos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados, de um banco de dados, partidas de sêmen congelado de 71 touros (35 Nelore e 36 Angus), utilizados em IATF de 13.174 vacas Zebuínas (*Bos indicus*) classificadas em novilha, solteira, primíparas e múltiparas, de propriedades localizadas no Cerrado e Pantanal Sul-Mato-Grossense. Dados reprodutivos de fêmeas, como o escore corporal, foram adicionados no início do protocolo de IATF e, acrescentados ao trabalho para correlacionar a taxa P/IA com os resultados obtidos em exames laboratoriais.

Os animais foram submetidos ao protocolo (D0) ao início da estação de monta, em seguida, as vacas foram submetidas à IATF, realizada por inseminadores de comprovada experiência, utilizando sêmen descongelado em descongelador automático a 36°C. O diagnóstico de gestação foi obtido por ultrassonografia transretal, 30 dias após a IATF.

3.1. Inseminação artificial em tempo fixo

O protocolo de IATF foi realizado em todas as vacas em estágios aleatórios do ciclo estral, recebendo um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (1g de progesterona) mais 2 mg I.M. de benzoato de estradiol no Dia 0 (primeiro dia do protocolo). Os dispositivos progesterona foram removidos no 8º dia de protocolo e todas as vacas receberam 0,150 mg I.M. de d-

cloprostenol (PGF2 α -análogo), 300 UI de eCG I.M. e 0,5 mg de cipionato de estradiol I.M.

No dia 8 ainda, todas as vacas foram marcadas na região sacral e da cabeça da cauda com bastão marcador. No 10º dia, a expressão de estro, avaliada no momento da IATF e, classificada de acordo com a proporção de tinta da cauda removido: 1 - nenhuma ou pouca remoção de tinta (sem expressão de estro), 2 - remoção parcial de tinta (baixa expressão de estro) e 3 - remoção quase completa ou completa da tinta (alta expressão de estro; SILVA et al., 2016).

A inseminação ocorreu em tempo fixo 48-52 horas após a retirada dos implantes, e 15 dias após animais foram colocados com touros Nelore até o final da EM de 3 meses. O diagnóstico de gestação foi realizado através da ultrassonografia transretal, 30 dias após a retirada dos touros.

3.2 Testes laboratoriais: Avaliação da qualidade do sêmen

Para determinação da qualidade espermática foram realizados os testes de motilidade e vigor pós-descongelamento, concentração e análise morfológica do sêmen congelado, teste de termorresistência rápida (TTR), análise espermática assistida por computador (CASA) e citometria de fluxo, de acordo com as metodologias descritas a seguir.

A avaliação da motilidade e vigor pós-descongelamento, foi obtida através da deposição de uma gota de sêmen em lâmina aquecida (35 a 37°C) e coberta com lamínula para observação em microscopia óptica com aumento de 20x, sendo os valores de motilidade expressa em porcentagem (CBRA, 2013). A concentração espermática foi determinada em hemocitômetro, na diluição de 1:100, sendo o resultado expresso em espermatozoides/ml.

Para a avaliação da concentração, foi retirado 20 microlitros do ejaculado, com o auxílio de uma pipeta de Sahli, diluindo-o na proporção de 1:200, em 4mL de solução de formol-citrato. Prosseguiu-se com o cálculo da concentração espermática, ou seja, o número de células presentes no ejaculado, realizado em câmara de Neubauer. Para a contagem, utiliza-se um microscópio com lentes

objetivas de 10x e 40x, sendo contados os espermatozóides de cinco quadrados grandes nos dois lados da câmara (CBRA, 2013).

A morfologia dos espermatozoides foi avaliada em microscópio de contraste de fase com aumento de 1000x. Para esta análise, foram consideradas as anormalidades de cabeça, peça intermediária e cauda, contando 200 células, classificando-as em defeitos maiores e menores. Uma alíquota das palhetas foi colocada em um frasco de vidro, lacrado e mantido em banho-maria, para realização do teste rápido de termorresistência à temperatura de 46°C por 30 minutos (CBRA, 2013). Ao final do período, a amostra foi analisada quanto às seguintes variáveis: motilidade e vigor pelo método subjetivo ao microscópio de campo de luz.

A análise computadorizada para avaliação da cinética espermática foi determinada pelo equipamento computer assisted semen analyse (CASA), modelo Ivos-Ultimate - Hamilton Thorne Biosciences, previamente ajustado (*setup*) de fábrica padrão, para análise de sêmen bovino. Foram utilizados 2 µL de sêmen, preenchidas por capilaridade na câmara Leja®. No CASA, foram selecionados dez campos para a leitura.

A técnica de citometria de fluxo congrega em si várias fases no decorrer dos procedimentos, o que compromete a funcionalidade da membrana em razão da maior possibilidade de ocorrência de alterações, especificamente no que tange às características referentes à motilidade e na morfologia espermática dos espermatozoides.

Os procedimentos de citometria de fluxo foram realizados utilizando o equipamento EasyCyte™ (IMV France) para a avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática e a polarização mitocondrial, equipado com utilizando sondas de fluorescência PI (iodeto de propídio) e JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro - 1,1',3,3' - iodeto de tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) e então a amostra foi encubada por 20 minutos a 37°C em ambiente escuro, analisados por meio do software CytExpert Acquisition (Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA).

A integridade estrutural da membrana plasmática e polarização mitocondrial foram avaliadas por citometria de fluxo, utilizando, respectivamente,

as sondas fluorescentes PI (iodeto de propídeo) e JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianine iodide), no aparelho EasyCyte IMV France. A análise realizada para a avaliação do potencial mitocondrial foi realizada utilizando a sonda fluorescente MitoTracker Green (MTGreen, Molecular Probes M7514, Eugene, OR, USA) (Celeghini et al., 2007). Foi adicionada à base anteriormente descrita 0,25 µl de MTGreen (1mM) e então a amostra foi encubada por 20 minutos a 37°C em ambiente escuro. As células com potencial mitocondrial positivo são coradas fortemente e as com baixo potencial são coradas fracamente e foram avaliadas por meio de histograma.

Para cada ensaio, pelo menos 10.000 células foram avaliadas pelo citômetro de fluxo para cada amostra. Os dados foram gerados em formato de gráfico de histograma, o que permitiu a visualização de todos os eventos visíveis, devidamente compensados pelo software de citômetro de fluxo própria matriz.

3.3 Análise estatística

Para os resultados P/IA, foi considerada a resposta binária (prenha ou vazias) e foi realizada a análise de regressão logística múltipla, assumindo um nível de significância de 5% e análise de correlação múltipla entre as variáveis (fertilidade dos lotes e resultados de exames laboratoriais). Os resultados foram analisados usando o software Proc Logistic incluído no Statistical Analysis System 9.1.3 (SAS Institute Inc., 2000). Os parâmetros mais relevantes observados no resultados do Proc Logistic considerados mais efetivos à prenhez, quando em conjunto (1) Integridade de membrana; (2) Polarização; (3) Vigor; (4) Defeitos totais; (5) Motilidade do CASA; (6) Motilidade Progressiva do CASA; (7) VSL; (8) ALH foram utilizados para a próxima análise, pois estes dados fornecem 'insights' sobre a possibilidade na elaboração de equações de predição de fertilidade de sêmen, aplicando com amparo da técnica de indução de árvore de decisão.

Com objetivo de analisar o ganho de conhecimento foi induzida a construção de árvore de decisão com base na massa de dados. As árvores de decisão foram induzidas no software Weka 3.8 com configurações padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de prenhez média foi de 50,00%, conforme Tabela 1, onde também verificamos as médias dos parâmetros analisados.

Tabela 1 - Valores médios dos parâmetros avaliados de (13.174 IATF).

Parâmetros	Mínimo/Máximo	Média	Desvio Padrão
P/IA (%)	21,21 a 70	49,59	0.50
ECC	1 a 6	3.5465	0,7446
Membrana Integra (%)	4,66 a 99,89	57.8769	27.5296
Polarização (%)	19,81 a 78,7	54.7199	15.0855
Motilidade (%)	30 a 70	44.1754	5.8481
Vigor	2 a 4	3.2845	0.5832
Defeitos Totais (%)	4 a 26	14.1202	6.4406
Defeitos Maiores (%)	2 a 26	9.4106	5.03722
Motilidade CASA (%)	4,30 a 79	46.2671	21.2803
Mot. Progressiva CASA (%)	2,60 a 48,20	30.3132	11.0954
VAP CASA ($\mu\text{m/s}$)	64,13 a 128,03	89.3629	13.6575
VSL CASA ($\mu\text{m/s}$)	54,93 a 108,31	73.1336	13.7913
Linearidade (%)	37,83 a 64,41	48.821	5.3611
STR CASA (%)	73,15 a 91,53	80.3027	5.3187
ALH CASA (μm)	4,33 a 10,38	7.0806	1.2038
VCL CASA ($\mu\text{m/s}$)	101,50 a 228,48	151.8147	27.2708
Motilidade TTR (%)	0 a 40	14.9309	8.6106
Vigor TTR	0 a 4	2.1991	0.8479
Destac. de Acrossoma (%)	1 a 17	2.9157	1.5687
Viáveis / dose ($10^6/\text{ml}$)	3 a 25	20.6014	11.3601

A análise de regressão logística dos principais fatores que influenciam na prenhez, resultou em um modelo de equação para a prenhez de IATF, com os seguintes parâmetros significativos: ECC (escore de condição corporal); INTEGRA (integridade de membrana); POLARIZADA (polarização mitocondrial); MOTCASA (motilidade total pelo CASA); VIGOR; DEFEITOS TOTAIS; PROG CASA (motilidade progressiva pelo CASA); VSL (velocidade retilínea).

$$P/IA = - 0,11 + (ECC \times 0,0589) - (INTEGRA \times 0,004) + (POLARIZADA \times 0,0070) + (MOTCASA \times 0,0109) + (VIGOR \times 0,15) - (DEFEITOS \text{ TOTAIS} \times 0,0069) - (PROGCASA \times 0,024) - (VSL \times 0,0052).$$

O R^2 encontrado foi de 0,07; considerado baixo. Assim, os parâmetros indicados foram submetidos a análise de árvore de decisão na análise subsequente. Também afim de validar a equação encontrada, foi utilizada com bancos de dados de 1.815 P/IA e os resultados foram positivos para a equação, correlacionando os resultados reais a campo com a probabilidade de prenhez da equação. (Tabela 2)

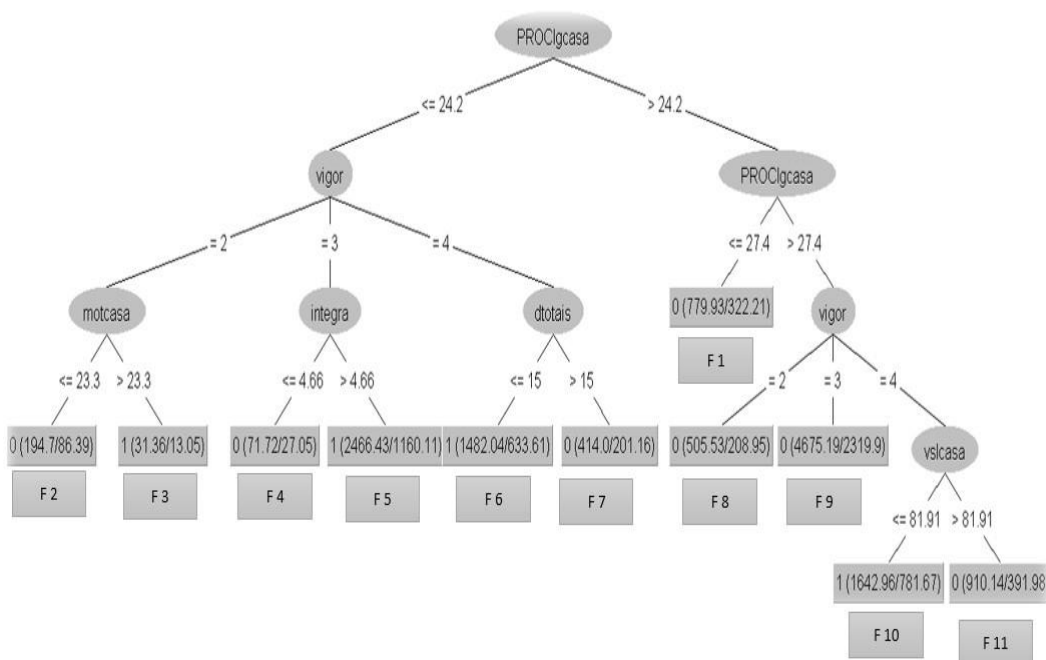
Tabela 2 – Porcentagem de prenhez a campo e % de predição de prenhez pela equação gerada e o número de inseminação artificial (IA) realizada.

Touro	% Prenhez a campo	% Prenhez na Equação	Nº de IA
A	48,32	53,34	149
B	59,86	53,44	461
C	50,44	53,83	113
D	57,77	51,99	180
E	63,01	52,39	146
F	50,47	50,73	628
G	43,47	50	138
Médias	53,33	52,24	
Total			1.815

Em relação a árvore de decisão, podemos observar uma árvore com 13.170 instâncias, obtidas pelo software Weka 3.8, por meio do classificador J48 com base nos resultados, podemos afirmar que o algoritmo 'ProgCASA' (Motilidade Progressiva) é mais o nó raiz, sendo o atributo mais importante para a tomada de decisão, em função de fornecer maior ganho de informação para o conjunto de dados, seguido de Vigor. Logo, vêm os atributos Motilidade Total (MotCASA), Membrana Íntegra (Integra) e, Defeitos Totais (Def. Totais). (Figura 1).

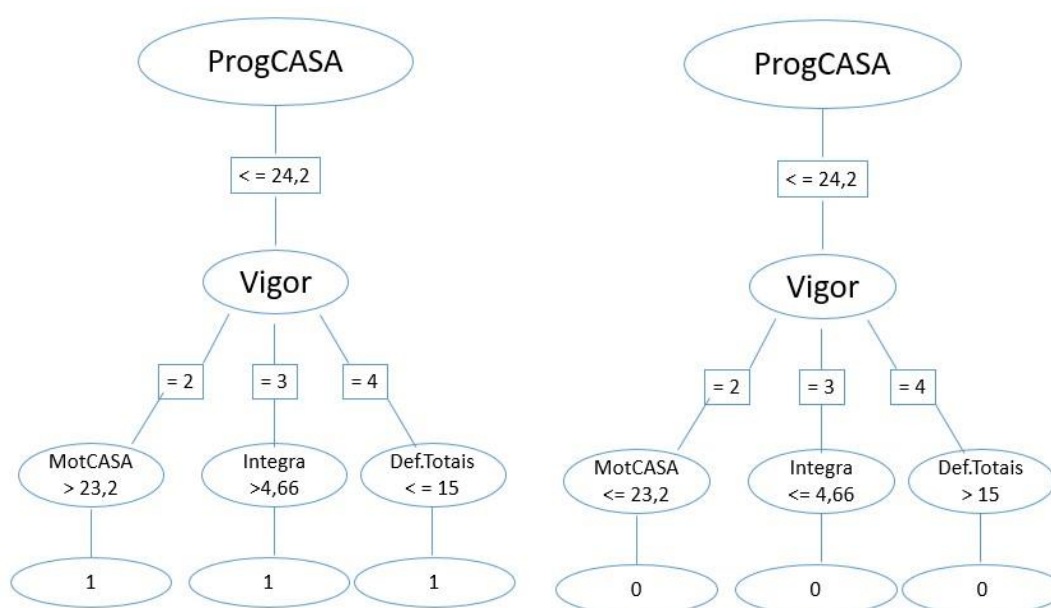
Para prenhez positiva, visto no nó raiz o ProgCASA no valor menor ou igual a 24,2% (sendo valores mínimos de 2,60 e máximo 48,20%) temos o subnó dependente do Vigor de 2, 3 e 4. A prenhez ocorreu em Vigor igual 2 e na folha de motilidade acima de 23,3%; Vigor igual a 3 e na integridade de membrana maior que 4,66% (valores mínimos de 4,66 a 99,89%); Vigor 4 com a percentagem de defeitos totais menor que 15% (valores mínimos de 4 e máximo 26%).

Ao considerar a % de ProgCASA no valor menor ou igual a 24,2, observa os nós Vigor como vacas “vazias” (sem gestação) ocorreram em Vigor igual 2 e na folha de motilidade menor ou igual que 23,3%; Vigor igual a 3 e na integridade de membrana menor ou igual que 4,66%; Vigor 4 a percentagem de defeitos totais maior que 15%.



F = folhas; PROClgcasa = Motilidade Progressiva no CASA; Motcasa = Motilidade Total no Casa; Vigor = Análise de vigor pós-descongelamento. Escala de 1-4; Integra = integridade de membrana no citômetro de fluxo; Dtotaal = percentuais de defeitos totais; vslcasa = VSL velocidade retilínea no CASA.

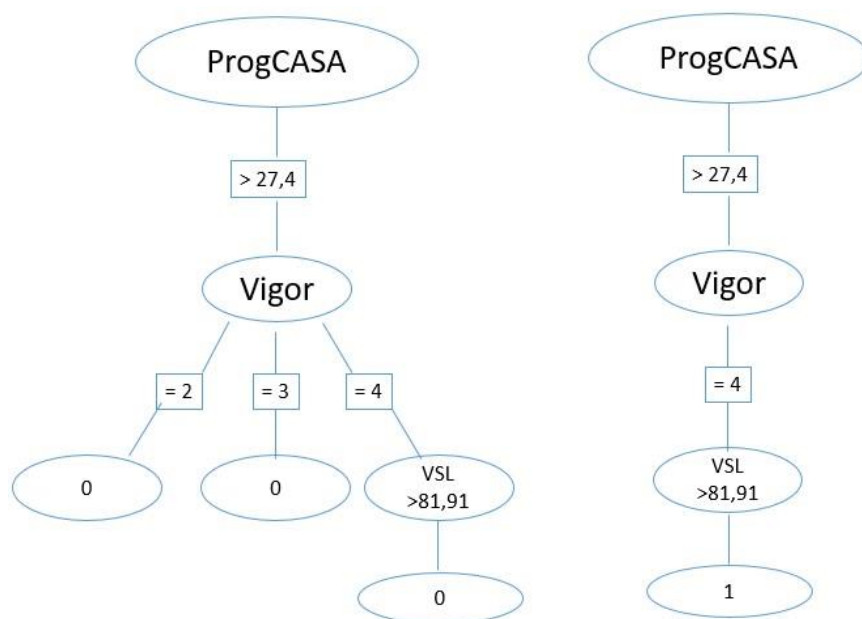
Figura 1- Saída da árvore de decisão obtidas pelo software Weka 3.8, por meio do classificador J48



ProgCASA = Motilidade Progressiva no CASA; Motcasa = Motilidade Total no CASA; Vigor = Análise de vigor pós-descongelamento na escala de 1-4; Integra = integridade de membrana no citômetro de fluxo; Def.totais = percentuais de defeitos totais; 1 = Prenhez e 0, Vazia (não gestação).

Figura 2- Árvore podada para Motilidade Progressiva (ProgCASA) com valor $\leq 24,2\%$

Ao examinar a porcentagem de ProgCASA no valor maior que $27,4\%$, observa os nós Vigor como vacas “vazias” (sem gestação) nos valores igual 2 e 3, independentemente de qualquer outro parâmetro. No Vigor 4 é inerente e tem um impacto maior – sendo positivo para prenhez junto ao atributo VSL (Velocidade progressiva) menor/igual $81,91\mu\text{m/s}$ (mínimo de $54,93$ e máximo $108,31\mu\text{m/s}$), a não gestação ocorre em valores maiores que $81,91\mu\text{m/s}$. (Figura 12)



ProgCASA = Motilidade Progressiva no CASA; Motcasa = Motilidade Total no CASA; Vigor = Análise de vigor pós-descongelamento na escala de 1-4; Integra = integridade de membrana no citômetro de fluxo; Def.totais = percentuais de defeitos totais; VSL Velocidade progressiva no CASA; 1 = Prenhez e 0, Vazia (não gestação).

Figura 3- Árvore de decisão podada para Motilidade Progressiva (ProgCASA) com valor > 27,4%.

Tabela 3 - Regras para Probabilidade de prenhez

ProgCASA 2,60 a 48,20%	MotCASA 4,30 a 79%	Vigor 2 a 4	Integra 4,66 a 99,89%	Def.totais 4 a 26%	VSL 54,93 a 108,03 µm/s	Casos	Confiança da Regra
>=27,4	-	-	-	-		0 (779,93)	70,76%
<=24,2	<=23,3	2				0 (194,7)	69,26%
<=24,2	>23,3	2	-	-	-	1 (31,36)	70,61%
<=24,2	-	3	<=4,66	-	-	0 (71,72)	72,61%
<=24,2	-	3	>4,66	-	-	1 (2.466,43)	68,01%
<=24,2	-	4	-	<=15	-	1 (1.482,04)	70,05%
<=24,2	-	4	-	>15	-	0 (414,0)	67,29%
>27,4	-	2	-	-	-	0 (505,53)	70,75%
>27,4	-	3	-	-	-	0 (4.675,19)	66,83%
>27,4	-	4	-	-	<=81,81	1 (1.642,96)	67,76%
>27,4	-	4	-	-	>81,91	0 (910,14)	69,89
Total						13.174	

A avaliação laboratorial pelo CASA é uma técnica muito útil para predição da fertilidade e para estudar os efeitos de vários procedimentos *in vitro* na motilidade espermática (FARREL *et al.*, 1993), o presente estudo mostrou uma correlação positiva da motilidade progressiva, Vigor, Motilidade, Membrana Íntegra e, Defeitos Totais e VSL (Tab. 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Cseh *et al.* (2003), cujos dados indicaram que touros com menores valores de VCL, VSL e VAP apresentaram menores taxas de fertilização. Após avaliar as velocidades espermáticas individuais (VCL, VSL e VAP), Nagy *et al.* (2015) observaram que a VAP apresentou maior correlação com as taxas de não retorno ao estro aos 30 e 75 dias ($R^2 = 0,7029$ e $0,6652$, respectivamente), sugerindo que este é um parâmetro de velocidade espermática com grande relevância clínica para predição de fertilidade.

Autores como Gillan *et al.* (2008), Kathiravan *et al.* (2008) e Vincent *et al.*, (2012) têm apresentado em suas pesquisas uma inter-relação positiva entre fertilidade no campo e mobilidade total e progressiva do sêmen bovino. Todavia, Allouche e colaboradores (2017) não concordam com essa conclusão de que a motilidade favorece a fertilidade, isso em razão de que em pesquisas por eles realizadas têm demonstrado uma taxa de fertilidade maior em touros que foram identificados com alta frequência de espermatozoides imóveis e menor taxa de motilidade total e progressiva (ALLOUCHE *et al.*, 2017).

Para Allouche e seus colaboradores (2017), a motilidade em excesso pode se constituir em um aspecto danoso e, portanto, desfavorável à qualidade da fertilidade, tendo em vista que os espermatozoides procurariam atingir de forma célere o oviduto e, antes da ovulação, não obteriam sucesso para alcançar e fecundar o ócito.

Os métodos subjetivos, segundo Berndtson *et al.* (1981); Kathiravan e colaboradores (2011) e Amann e Wabersky (2014), têm demonstrado ao longo dos anos uma inter-relação de sucesso no que diz respeito à motilidade com a fertilidade. Os métodos subjetivos, conforme informam Gillan *et al.* (2008), também se mostraram efetivos e satisfatórios a partir de análises

computadorizadas, principalmente relacionados à morfologia, anormalidades de tipologias diversas – geralmente associadas à limitação da capacidade de fertilidade de touros; e o incremento da mortalidade embrionária, como apontam as pesquisas de Walters e colaboradores (2005).

Mas os parâmetros que demonstram alta funcionalidade referentes aos métodos subjetivos não se resumem aos supracitados, outros têm sido sugeridos como estratégias para dirimir eventuais danos e potencializar fatores-chave na fertilidade dos espermatozoides, a exemplo da integridade de membrana, indicados por Flesch e Gadella (2000); e acrossoma, apontados por Oura e Toschimori (1990).

A propósito ainda dos parâmetros, Thomas e colaboradores (1998) e Graham e Mocé (2005) deram contribuições relativas à atividade mitocondrial, enfatizando à relação intrínseca da atividade mitocondrial com a motilidade da célula e também, a integridade da cromatina.

Nogueira *et al.* (2019) informam que, no que diz respeito à qualidade do sêmen, esta é obtida por meio de exames e aferições “subjetivas de motilidade, proporção de espermatozoides morfologicamente normais e concentração de espermatozoides por dose.” Não obstante, ressaltam os autores em questão, tais métodos podem não ser instrumentos suficientemente precisos em sua execução, o que pode interferir no processo de avaliação e determinação da fertilidade das amostras, “uma vez que não são avaliados os processos necessários para a fecundação, tais como a capacitação e a reação acrossômica, e que nenhum teste laboratorial utilizado isoladamente pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen.”

Estudos de Silva, *et al*, 2019, propôs outro modelo de predição de fertilidade, onde foi incluindo parâmetros análises convencionais, CASA e citometria defluxo ($R^2 = 0,481$), onde foram identificados seis atributos do sêmen que contribuíram para a fertilidade sendo eles: Motilidade Progressiva, velocidade média (VAP), velocidade retilínea (VSL), polarização mitocondrial (Polariz), integridade de acrossoma (LIVERAFITCPNA) e, integridade de membrana (INTALEX). Equação:

Esses resultados encontrados demonstrados pelo modelo de Silva *et al.* 2019, identificou seis atributos espermáticos que contribuíram para a fertilidade. Primeiro, a integridade da membrana já considerada por vários autores como um potencial marcador de fertilidade.

A expressão de cio teve influência na prenhez sendo a classificação de 1: 41,66% (348/1293); 2: 46,32% (408/1293) e; 3: 53,17% (537/1293), corroborando com resultados obtidos por NOGUEIRA *et al.*, 2016, onde verificou a utilização de escores de remoção de tinta, com bastões marcadores, para avaliação da manifestação de cio no momento da IATF, é útil para identificar vacas com maior expressão de cio e, conseqüentemente, maior prenhez na IATF

Autores como Arruda *et al.* (2011), Brito *et al.* (2004) e Nogueira *et al.* (2019) enfatizam que das características qualitativas do sêmen, é de suma relevância atentar para a necessidade de melhoria da capacidade dos bioensaios, notadamente no que concerne ao “poder correlativo dos bioensaios com espermatozoides *in vitro* para a predição da fertilidade a campo envolve o uso da modelagem estatística, com grandes conjuntos de dados de fertilidade (NOGUEIRA *et al.*, 2019).

5. Conclusão

A visão holística da análise permitirá o entendimento e definição da probabilidade de prenhez, a partir de mecanismos metabólicos compensatórios que podem ser avaliados através de métodos mais complexos de análise. A árvore de decisão criada mostra que não existem pontos de cortes fixos, mas a possibilidade de reequilibrar e fazer compensações de determinadas características com outros fatores que compõem o modelo estatístico. Esse equilíbrio permite utilizar doses/partidas que pudessem ser descartadas, com grandes perspectivas de bons resultados, mostrando que o modelo é multifatorial com situações de compensação que devem ser consideradas nas análises.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLOUCHE, L. et al. Bull fertility and its relation with density gradient selected sperm. **International journal of fertility and sterility**, Tehran, v. 11, n. 1, p.55-62, jan. 2017.

AMARAL, T. B. do.; SERENO, J. R. B.; PELLEGRINI, A. O. Fertilidade, funcionalidade e genética em touros zebuínos [recurso eletrônico]. Corumbá: **Embrapa Pantanal**: Campo Grande MS, 2009. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/854676/1/amaral01.pdf> Acesso em: 3 maio. 2021.

ARRUDA, R. P.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J. D.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A., CARVALHO, H. F., OLIVEIRA, L. Z. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151, abr./jun. 2011.

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

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial -. **Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen**, 2010. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/relatorio2010.pdf> Acesso em: 12 maio. 2021.

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Manual de inseminação artificial**. São Paulo: Copy Service Indústria Gráfica, 2013.

BADINAND, F.; FONTBONNE, A.; ADOUE, C. Préparation, conditionnement, conservation et utilisation de la semence du chien en insémination artificielle. **Elevage et Insémination**, n. 239, p. 3-15, 1990.

BARBOSA, R. T.; MACHADO, R. Panorama da inseminação artificial em bovinos. **Documentos 84**. Embrapa Pecuária Sudeste. São Carlos. 2008.

BARROS, C. M.; ERENO, R. L.; NOGUEIRA, M. F. G. Estratégias de manejo para maximização da fertilidade em fêmeas de corte. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 42., 2005, Goiânia. Anais... Goiânia: SBZ, 2005.

BERGSTEIN, TG.; WEISS, RR.; BICUDO, SD. **Técnicas de análise de sêmen**. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.38, n.4, p.189-194, out./dez. 2014.

BO, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-pointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002

BRITO, L.F.; SILVA, A.E.; RODRIGUES, L.H.; VIEIRA, F.V.; DERAGON, L.A.; KASTELIC, J.P. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and 67 semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, v.70, n.3, p.181-190, 2002.

BRITO, BF.; SANTOS, BMB.; MAIA, LCM.; NATTA, MFR., NUNES, JF.; SALGUEIRO, CCM. Nova biotécnica de imunosexagem de espermatozoides de ruminantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.42, n.3-4, p.90-95, jul./dez. 2018.

CAMARGO, L.S., FREITAS-DELL'AQUA, C.P., SCHMITH, R.A., GUASTI, P.N., VOLPATO, M., SOUZA, F.F.D., 2017. New multicolor protocol to assessment dog spermatozoa by flow cytometer. **Anim. Reprod.** 14, 311.

CARNEIRO, J.A.M., CANISSO, I.F., BANDEIRA, R.S., SCHEEREN, V.F.C., FREITAS-DELL'AQUA, C.P., ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., DELL'AQUA, J.A., 2018. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability. **Anim. Reprod. Sci.** 192, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.020>

CAVALCANTE, R. R. Avaliação e particularidades da inseminação artificial no Norte e Nordeste do Brasil. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 9, 1991, Belo Horizonte, MG. **Anais ... Belo Horizonte**: CBRA, 1991. v.2, p.139-145.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO – Cbra. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3^a.ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013, 104p

CELEGHINI, E.C.; DE ARRUDA, R.P.; DE ANDRADE, A.F.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reprod Domest Anim** 42: 479-488, 2007.

CSEH, S.; POLICHRONOPOULOS, T.; SOLT, L. (2003). Prediction of bull fertility by computer assisted semen analysis. **Reprod Fert Develop.** v.16, p. 128-129.

CHAFFAUX, St., BIANCHI, P., BHAT, P. et al. L'échographie en temps réel par voie transrectale-intérêt pour le diagnostic de gestation chez la vache. *Rec Méd Vét*, n. 164, p. 101-108, 1988.

EVENSON, D.P.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Method Cell Sci**, v.22, p.169–189, 2000.

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

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. In: Canine and feline endocrinology and reproduction. Philadelphia, W.B. **Saunders Company**, p.785. 1996.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochem Biophys*, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FREITAS-DELL'AQUA CP, CRESPILO AM, PAPA JÁ, DELL'AQUA JUNIOR. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v.33, n4, p. 213-222. 2009

GARDNER, D. L.; SEIDEL, JR, G. E. Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Canadian Journal of Animal Science*. v. 83, p. 375-384, 2003.

GILLAN, L. et al. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 103, n. 3-4, p.201-214, jan. 2008.

GODOI, C.R., SILVA, E.F.P. e PAULA, A.P. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 14, Ed. 119, Art. 807, 2010. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/uploads/df7498b8994c6ca112dfa99cf76c0496.pdf> Acesso em: 12 mar. 2021.

HAFEZ. E.S.E. **Reproduction in farm animals** 5. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987, 649 p.

HARROP, A. E. **Reproduction in the dog**. London: Bailliere, Tindal and Cox, 1960.

INFORZATO, G.R. Emprego de IATF (Inseminação Artificial em Tempo Fixo) Como Alternativa na Reprodução da Pecuária de Corte. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. ISSN: 1679-7353. Ano VI – Número 11 – julho de 2008 – Periódicos Semestral.

JOLLY, P.D., McDOUGALL, S., FITZPATRICK, L.A. Physiological effects of undernutrition on postpartum anoestrus in cows. *Journal of Reproduction & Fertility*, v. 49, p.477-492, 1995.

KÄHN, W. Sonographic imaging of the bovine fetus. **Theriogenology**, v. 33, n. 2, p. 385-396, 1990.

KASTELIC, J.P., GERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Ultrasonic detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on days 10 to 22 in heifers. **Theriogenology**, v. 35, n. 3, p. 569-581, 1991.

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. **Reprod Domest Anim**, v. 46, p. 165-172, 2011.

LORENZETT, C. D. C.; TELÖCKEN, A. V. Estudo comparativo entre os algoritmos de mineração de dados *random forest* e J48 na tomada de decisão. 2016. In: **II Simpósio de Pesquisa e Desenvolvimento em Computação, 2016, Cruz Alta**. Anais... Cruz Alta: II Simpósio de Pesquisa e Desenvolvimento em Computação.

MARTINI, A. P.; PESSOA, G. A.; RUBIN, M. I. B. Conception rate according to sire, body condition score and estrus occurrence of suckled *Bos taurus* beef cows submitted to timed artificial insemination. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.74, n.3, p.375-382, 2022.

MARTINS, C. F.; SIQUEIRA, L. G. B.; OLIVEIRA, C. T. S. A. M.; SCHWARZ, D. G. G.; OLIVEIRA, F. A. S. A. M. de. Inseminação artificial: uma tecnologia para o grande e pequeno produtor. Planaltina, DF. 2009,33 p. Embrapa Cerrados, **Documentos 261**.

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

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

NAGY, Á; POLICHRONOPOULOS, T.; GÁSPÁRDY, A.; SOLTÍ, L.; CSEH, S. 2015. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. **Acta Vet Hung**, v. 63, p.370–381, 2015.

NOGUEIRA, É.; SILVA, A. S.; MARQUES JÚNIOR, H. R.; NOGUEIRA, R. J.; BORGES, J. C. Taxa de prenhez de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF no Planalto Boliviano Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011b. 5p. (Embrapa Pantanal. **Circular Técnica**, 101).

NOGUEIRA, É; SILVA, A. S; DIAS, A. M.; ITAVO, L. C. V.; BATISTOTE, E. Taxa de prenhez de vacas Nelores submetidas a protocolos de IATF no Pantanal de MS. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011a. 6 p. (Embrapa Pantanal. **Circular Técnica**, 97).

NOGUEIRA, E.; SILVA, C. S.; SILVA, J. C. B.; GARCIA, W. R.; ANACHE, N. A.; SILVA, K. C.; POTIENS, J. R.; SILVA, E. V. da C. e. Qualidade do sêmen e resultados em programas de IATF em bovinos. **REUNIÃO ANUAL DA IV ABRAA Associação Brasileira de Andrologia Animal**. 2019. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199607/1/Qualidade-semen-2019.pdf> Acesso em: 1 maio. 2021.

OLIVEIRA, L. Z.; MONTEIRO, F. M.; ARRUDA, R. P. De; CELEGHINI, E. C. C. The Importance of Semen Quality in AI Programs and Advances in Laboratory Analyses for Semen Characteristics Assessment. In. **Success in Artificial Insemination** - Quality of Semen and Diagnostics Employed. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/52022> Acesso em: 22 mar. 2022.

ORTEGA, A. M.; IZQUIERDO, A. C.; GÓMEZ, J. J. H.; OLIVARES-CORICHI, I.M.; TORRES, V. M. M.; MÉNDEZ, J. J. V. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. **Interciencia**, v.28, p.699-704, 2003.

PETERS, A. R., BALL, P. J. H. **Reproducción del Ganado Vacuno**. Zaragoza: Acribia, 1991.

POTIENS, José Roberto. Análises computadorizadas da motilidade espermática (CASA): conceitos e possibilidades de padrões. **Rev. bras. reprod. anim**, p. 91-101, 2022.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim Reprod Sci**, v. 38, p.1-36, 1995.

SÁNCHEZ, A., RUBILAR, J. Puppies obtained using artificial insemination with chilled extended sêmen. **Archivos de Medicina Veterinária**, v. 33, n. 1, p. 105-110, 2001.

SAS INSTITUTE. **User software**: changes and enhancements through release. Cary: SAS Institute, 2000.

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

SEVERO, N. C. Impacto da inseminação artificial na indústria bovina no Brasil e no mundo. **Rev V&Z Minas**, v. 28, n. 101, p.16-22, 2009.

SEVERO, N. C. **História ilustrada da inseminação artificial**. São Paulo: Livre Expressão, 2013. 408p.

SEVERO, N. C. História da inseminação artificial no Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 39, n.1, p.17-21, jan./mar. 2015. Disponível em: [http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n1/pag17-21%20\(RB542\).pdf](http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n1/pag17-21%20(RB542).pdf) Acesso em: 22 abr. 2021.

SHARMA, M. et al. Inter relationship between some routine semen evaluation parameters in Jersey X local hill cattle crossbred bulls. **Open veterinary journal**, Tripoli, v. 2, n. 1, p.26- 31, mai. 2012.

SILVA, C. S. et al. QUALIDADE DE SEMEN DE TOUROS NELORE E ANGUS CLASSIFICADOS POR ÍNDICES DE FERTILIDADE. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Ciências Veterinárias) – FAMEZ/UFMS UTT, M. D. Prediction of bull fertility. **Anim. Reprod. Sci.** v. 169, p. 37-44, 2016.

SILVA, L. D. M.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; Inseminação Artificial em Cães. In: GONSALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2002, Cap.5.

SILVA, A. S.; BORGES SILVA, J. C.; ABREU, U. G. P.; BATISTA, D. S. N.; ANACHE, N. A.; BEZERRA, A. O.; JARA, J. P.; NOGUEIRA, E. Escore de cio avaliado com bastões marcadores influencia as taxas de gestação de vacas nelore submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. *Animal Reproduction*, v. 13, n. 3, p. 451, 2016.

THUNDATHIL, J. C.; DANCE, A. L.; KASTELIC, J. P. Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 397–405, 1 jul. 2016.

TOTEY, S.M., SINGH, G., TANEJA, M. et al. Ultrasonography for detection of early pregnancy following embryo transfer in unknown breed of Bos indicus cows. *Theriogenology*, v. 35, n. 3, p. 487-497, 1991.

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

WEBB, D. W. Artificial Insemination in Dairy Cattle. In: **Dairy Production Guide**. Florida, September, 1992.

VARNER, D.D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, Los Altos, v. 70, n. 3, p.448-462, ago. 2008.

VIEIRA, E. M. DE A; NEVES, N. T. DE A. T.; OLIVEIRA, A. C. C, DE O; MORAES, R. M DE; NASCIMENTO, J. A do. 2018. Avaliação da performance do algoritmo J48 para construção de modelos baseados em árvores de decisão. **Revista Brasileira de Computação Aplicada**. 10, 80–90.

VINCENT, P. et al. Bovine semen quality control in artificial insemination centers. **Animal reproduction**, Belo Horizonte, v. 9, n. 3, p.153–165, jul-set. 2012.