

JEANNE BROCH SIQUEIRA

**RELAÇÃO DA FERTILIDADE DE SÊMEN BOVINO CONGELADO COM
TESTES DE AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA “IN VITRO”.**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
“Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

**À “mainha”, pela vida...
pelo amor incondicional...
por tudo...**

“Não deixe que nenhum empecilho se interponha entre você e sua felicidade, entre você e suas conquistas, entre você e seus sonhos. Queira de verdade, pense de maneira positiva, ofereça sempre mais do que as pessoas esperam de você. Aos poucos, você conquistará seu espaço no mundo”.

Tadashi Kadomoto

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador José Domingos Guimarães, pelo empenho e participação nas atividades desenvolvidas, confiança, paciência nos momentos difíceis e, principalmente, por acreditar e incentivar desde o início.

Aos membros da banca examinadora, professores Eduardo Paulino da Costa, Marc Henry, Ciro Alexandre Alves Torres e Giovanni Ribeiro de Carvalho por participarem da equipe e pelas sugestões para o trabalho.

Ao Departamento de Medicina Veterinária desta Universidade pela oportunidade de desenvolvimento do curso.

À Agro-Pecuária CFM Ltda – Fazenda São Francisco, à pessoa do Sr. Rodney Hobbs, pela colaboração e doação das amostras de sêmen e disponibilização dos resultados de campo.

À minha família: Paulo e Rosane (pais sempre orgulhosos), Roberta e Andréa (irmãs amadas), Jhonathan (o rei da casa) e Luíza (avó querida, que de seu jeito muito particular também torceu por mim).

Á Thiago, que conviveu mais intensamente com o cansaço, mau humor, e estresse, características peculiares dos passos finais desta caminhada. Pelo carinho e paciência em todos os momentos e pela confecção das fotos exibidas neste trabalho.

Ao Seu Nenzinho, funcionário do Laboratório de Reprodução Animal, por sua dedicação, amizade e ótimo humor.

As amigas Letícia e Carol pelo “apoio moral” durante a realização deste trabalho; e Aline, Juliana e Marilú pela recepção carinhosa nos primeiros meses de Viçosa.

Aos amigos do coração Alessandra Estrela e Augusto Cezar pelo carinho especial de muitos anos.

Aos colegas de pós-graduação do Laboratório de Reprodução Animal, Belmiro, Edílson, Flávio, Giórgia, Márcio e Rafael pelo convívio durante esses anos.

Aos poucos, mas bons amigos de Viçosa, e a todas as pessoas que comigo conviveram e de alguma forma me ajudaram durante a realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

BIOGRAFIA

JEANNE BROCH SIQUEIRA, filha de Paulo Roberto Siqueira e Rosane Maria Broch Siqueira, nasceu na cidade de Linhares, Espírito Santo, em 25 de setembro de 1977.

Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - Bahia, em 1997, graduando-se em fevereiro de 2002.

Em abril de 2002, iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária, na área de Reprodução Animal, na Universidade Federal de Viçosa, tendo concluído o mesmo em fevereiro de 2004.

ÍNDICE

| | Páginas |
|--|---------|
| LISTA DE TABELAS..... | viii |
| LISTA DE FIGURAS..... | x |
| RESUMO..... | xix |
| ABSTRACT..... | xiii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1. A estrutura dos espermatozóides..... | 3 |
| 2.2. Membrana plasmática dos espermatozóides..... | 4 |
| 2.3. Mecanismo de lesão celular durante o congelamento/descongelamento dos espermatozóides | 7 |
| 2.4. Capacitação espermática e reação acrossômica..... | 10 |
| 2.5. Métodos de avaliação espermática pós-descongelamento..... | 12 |
| 2.5.1. Características físicas e morfológicas do sêmen..... | 14 |
| 2.5.2. Teste de termo-resistência lento em sêmen congelado/descongelado. | 16 |
| 2.5.3. Avaliação da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides (teste hiposmótico)..... | 19 |
| 2.5.4. Teste de reação acrossômica..... | 24 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 26 |
| 3.1. Localização e animais do experimento..... | 26 |

| | |
|--|----|
| 3.2. Congelamento de sêmen..... | 27 |
| 3.3. Inseminação artificial..... | 27 |
| 3.4. Taxa de gestação..... | 28 |
| 3.5. Exames laboratoriais..... | 29 |
| 3.5.1. Avaliação física e morfológica do sêmen congelado/descongelado.... | 29 |
| 3.5.2. Teste de termo-resistência lento em sêmen congelado/descongelado ... | 29 |
| 3.5.3. Avaliação da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides (teste hiposmótico)..... | 30 |
| 3.5.4. Teste de reação acrossômica (Naftol amarelo/eritrozina B)..... | 31 |
| 3.6. Análise estatística..... | 32 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 33 |
| 4.1. Avaliação física e morfológica do sêmen congelado/descongelado..... | 33 |
| 4.2. Teste de termo-resistência lento em sêmen congelado/descongelado..... | 39 |
| 4.3. Integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides (teste hiposmótico)..... | 44 |
| 4.4. Teste de reação acrossômica (Naftol amarelo/eritrozina B)..... | 51 |
| 4.5. Taxa de gestação..... | 54 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 62 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 63 |
| 7. ANEXO..... | 74 |

LISTA DE TABELAS

| | Páginas |
|--|---------|
| Tabela 1. Padrões para desclassificação de sêmen descongelado de doadores da espécie bovina..... | 15 |
| Tabela 2. Características físicas e morfológicas de partidas de sêmen congelado/descongelado, e taxa de gestação de touros da raça Nelore..... | 34 |
| Tabela 3. Correlações Simples de Pearson da taxa de gestação, com testes complementares de sêmen congelado/descongelado de touros da raça Nelore..... | 36 |
| Tabela 4. Características físicas (motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático) de sêmen congelado/descongelado de touros da raça Nelore, submetidas ao teste de Termo-resistência lento (37°C por 3 horas de incubação)..... | 40 |
| Tabela 5. Parâmetros espermáticos de sêmen congelado/descongelado com suas respectivas taxas de gestação obtidas de acordo com as partidas de sêmen..... | 47 |

| | |
|---|----|
| Tabela 6. Correlações Simples de Pearson entre motilidade espermática pós-descongelamento (MOT), células reativas ao teste hiposmótico (teste HO), teste de reação acrossômica (RA) e teste de termo-resistência ao final de 3 horas de incubação (TTR _{T180})..... | 49 |
| Tabela 7. Taxa de gestação obtida por partida de sêmen de touros da raça Nelore..... | 56 |
| Tabela 8. Taxa de gestação por inseminador alcançada em estação reprodutiva de rebanho de fêmeas da raça Nelore..... | 57 |
| Tabela 9. Taxa de gestação por serviço alcançada em estação reprodutiva de rebanho de fêmeas da raça Nelore..... | 59 |
| Tabela 10. Taxa de gestação por retiro alcançada em estação reprodutiva de rebanho de fêmeas da raça Nelore..... | 59 |
| Tabela 11. Taxa de gestação de acordo com o status reprodutivo de fêmeas da raça Nelore..... | 60 |

LISTA DE FIGURAS

| | Páginas |
|--|---------|
| Figura 1. Tipos de dobramento de cauda dos espermatozóides submetidos ao teste HO..... | 31 |
| Figura 2. Motilidade espermática progressiva retilínea (%) durante o TTR para amostras de sêmen bovino congelado/descongelado. T0: primeira avaliação, logo após o descongelamento; T60: segunda avaliação à 60 minutos; T120: terceira avaliação à 160 minutos; T180: quarta avaliação à 180 minutos..... | 42 |
| Figura 3. Espermatozóides de bovinos submetidos ao teste HO apresentando vários tipos de dobramento de cauda. Material fixado em formol-salina visualizado em microscopia de contraste de fase sob objetiva de imersão com aumento 1250x (A, B e C) e de 400x (D, E, F, G e H)..... | 45 |

RESUMO

SIQUEIRA, Jeanne Broch, M. S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2004.
Relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com testes de avaliação espermática “in vitro”. Orientador: José Domingos Guimarães. Conselheiros: Eduardo Paulino da Costa e Ciro Alexandre Alves Torres.

O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre os testes complementares (teste hiposmótico - teste HO, teste de termo-resistência lento - TTR e teste de reação acrossômica - RA) com os testes de avaliações convencionais (aspectos físicos e morfológicos) de sêmen bovino congelado/descongelado, relacionando os valores com os índices de prenhez. Utilizou-se 23 partidas de sêmen congelado/descongelado de 13 touros adultos da raça Nelore. O sêmen foi coletado e diluído em meio tris-gema de ovo, envazado em palhetas finas (0,25 mL) com concentração de 25×10^6 espermatozóides total por dose. A avaliação física do sêmen constituiu-se de motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático pós-descongelamento. Os defeitos espermáticos foram classificados em maiores, menores e totais. Para o teste HO, 20 μ L de sêmen congelado/descongelado, foi adicionado a 1,0 mL de uma solução de frutose na concentração de 100mOsm/L previamente aquecida à 37°C, e posteriormente incubado por uma hora. O TTR consistiu em submeter as partidas de sêmen pós-descongelamento à incubação em banho Maria à 37°C durante 3 horas (T0: 0 hora; T1: 60 minutos; T2: 120 minutos; T3: 180 minutos), avaliando-se a motilidade e o vigor espermático. Para realização do teste de reação acrossômica foi utilizada a técnica do Naftol amarelo/eritrosina B para identificar a porcentagem de espermatozóides com acrossoma reagido após o processo de

congelamento/descongelamento. Realizou-se a correlação simples de Pearson entre os testes HO, TTR e RA com a motilidade espermática pós-descongelamento e a taxa de prenhez. A taxa de prenhez entre partidas dentro e entre touros foi avaliada pelo teste de Qui-quadrado a 5% de probabilidade de erro. Análise de regressão logística foi efetuada no intuito de avaliar os efeitos fixos tais como: efeito do touro, partida, retiro, status reprodutivo e inseminadores. Os valores médios da motilidade espermática progressiva retilínea pós-descongelamento avaliados pelo TTR foram de 53,48% (T0), 43,69% (T1), 35,88% (T2) e 33,04% (T3). A porcentagem de células reativas ao teste HO encontrada foi de 37,89%. Correlação positiva e de média intensidade foi encontrada para a motilidade espermática progressiva retilínea pós-descongelamento e o teste HO (0,21). Entretanto, a correlação da motilidade no T3 com o teste HO foi alta (0,64), demonstrando que os espermatozóides que mantiveram a integridade de sua membrana plasmática após a criopreservação, permaneceram viáveis por mais tempo. A porcentagem de células que apresentaram acrossoma reagido pós-descongelamento foi de 9,85%. Correlações negativas de média e alta intensidade (-0,25 e -0,46, respectivamente) foram encontradas para o teste de reação acrossômica com a motilidade espermática progressiva retilínea pós-descongelamento e após 3 horas de incubação. Não houve correlação ($p>0,05$) do TTR, teste HO, RA e motilidade pós-descongelamento com a taxa de gestação. Não houve neste estudo, um parâmetro que considerado isoladamente, avaliasse a capacidade fertilizante do sêmen, visto que a viabilidade espermática é uma questão multifatorial associada a características de integridade estrutural e funcional de seus componentes. Portanto, as características estudadas, não podem ser consideradas isoladamente para avaliar com acurácia, a capacidade fertilizante do sêmen congelado/descongelado.

ABSTRACT

SIQUEIRA, Jeanne Siqueira, M. S., Universidade Federal de Viçosa, March 2004.
Relationship of bovine frozen semen fertility with “ in vitro” spermatic evaluation. Advisor: José Domingos Guimarães. Committee members: Eduardo Paulino da Costa and Ciro Alexandre Alves Torres.

The objective of this study was evaluate the relationship between complementary tests (hypoosmotic swelling test - HOST, thermo resistance test - TRT, and acrossome reaction test – AR test) with the conventional evaluation tests (physical and morphologic aspects) of bovine frozen/thawed semen, the values were correlated with the conception rate. Twenty-three frozen specimens from 13 Nelore bulls were used. The semen was collected and diluted in standard egg yolk, packing in 0,25mL straws with concentration of 25×10^6 viable spermatozoa per by pallet. The physical evaluation of the semen was constituted of post-thawed spermatic motility and vigour. The spermatic defects were classified in major, minor and total defects. For HOST, 20 μ L of frozen/thawed semen, was added to 1,0 mL of a fructose solution in the concentration of 100mOsm/L previously heated to 37°C, later on incubation for one hour. TRT consisted of submitting the post-thawed semen specimens to the incubation in water bath at 37°C for 3 hours (T0: 0 hour; T1: 60 minute; T2: 120 minute; T3: 180 minute), being evaluated spermatic motility and vigour at each time (T). For the AR test the technique of naphthol yellow and erithrosin B was used to identify the percentage of spermatozoa with acrossome reacted after the frozen/thawed. To check the correlations between HOST, TRT and AR test with spermatic motility and pregnancy rate comparisons inside each bull and among different bulls were done by

Qui-square at a significance rate of 5%. Analysis of regression logistics was made to evaluating the fixed effects as: effect of the bull, frozen semen specimens, retreat, reproductive status and inseminators. The average values for the spermatic motility of frozen/thawed semen evaluated by TRT were of 53.48% (T0), 43.69% (T1), 35.88% (T2), and 33.04% (T3). The percentage of reactive cells found in HOST was 37.89%. Positive correlation of average intensity were found for spermatic motility post-thawed and the HOST (0,21). Weak and positive correlation of the T3 motility with HOST was high (0.64), demonstrating that the spermatozoa maintained the functionality of its plasmatic membrane after the cryopreservation, stayed viable for more time. The percentage of cells that presented acrossome reaction post-thawed was 9.85%. Negative correlations of average and high intensity (-0.25 and -0.46, respectively) were found for acrossome reaction test and the spermatic motility post-thawed and after 3 hours of incubation. No correlation ($p>0,05$) of TRT, HOST, AR test and post-thawed motility with the conception rate was found. There was any parameter which considered separately, could evaluate the fertilizer capacity of the semen, since the spermatic viability is multifatorial question associated with the characteristics of structural and functional integrity of their components. No significant correlation ($p>0,05$) of TRT, HOST, AR test and post-thawed motility with the pregnancy rate was found. The characteristics analysed may not be considered alone to evaluate the fertilizing capacity of the frozen/thawed semen.

1. INTRODUÇÃO

A gradativa melhoria nas condições de manejo, alimentação e sistemas de criação de bovinos, assim como a exigência de maior produtividade animal, tanto nos rebanhos de elite, como nos de criação industrial para carne, tem imposto a crescente necessidade de utilização da inseminação artificial (IA). Esta foi a primeira biotécnica utilizada comercialmente trazendo grande impacto nos sistemas de produção animal. Dentre as inúmeras vantagens de sua aplicação, podemos citar a facilidade de comercialização e transporte, controle de doenças sexualmente transmissíveis e, principalmente, o expressivo ganho genético. Desse modo, a qualidade do sêmen congelado/descongelado é um dos fatores que podem influir sobre o índice de fertilidade de fêmeas bovinas.

Esse quadro mostra claramente a necessidade de se adotar um método eficiente para estimar a fertilidade de touros doadores de sêmen (DEN DAAS, 1997). Sob este aspecto, o desenvolvimento de provas laboratoriais visando avaliar com maior acurácia o desempenho de partidas de sêmen, tem sido a meta de numerosos programas de pesquisa no campo da inseminação artificial. Assim, surgiram recomendações de exames envolvendo a capacidade de resistência espermática ao calor (teste de termo-resistência) (ARRUDA, 1988); desenvolvimento de métodos de coloração, que aumentaram as possibilidades de uma análise mais criteriosa da integridade acrossomal dos espermatozóides (BRYAN e AKRUK, 1977); e a utilização de testes para avaliar a integridade funcional dos espermatozóides por meio de soluções hiposmóticas (REVELL e MRODE, 1994), além das avaliações convencionais de aspectos físicos e morfológicos do sêmen.

Relação positiva entre esses parâmetros permitirá a utilização destes testes para estimar a fertilidade e características zootécnicas de reprodutores bovinos ainda na fase de avaliação durante a quarentena em centrais de inseminação, evitando-se gastos desnecessários com a manutenção de animais de baixa fertilidade nas Centrais de Inseminação Artificial, e otimizando o tempo para a produção de sêmen de novos reprodutores.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a relação entre os testes: hiposmótico (avaliação da integridade funcional dos espermatozoides), de reação acrossômica e de termo-resistência lento com os testes de avaliações convencionais (aspectos físicos e morfológicos) de sêmen bovino congelado/descongelado. Desta forma, identificar os testes complementares que possibilitem aumentar a acurácia na avaliação de sêmen congelado em prever o potencial fecundante do sêmen bovino criopreservado correlacionados com os índices de prenhez.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A estrutura dos espermatozóides

Os espermatozóides originam-se dos testículos a partir de células primordiais da linhagem espermatogênica localizadas nos túbulos seminíferos, num processo denominado espermatogênese. Do ponto de vista biológico, os espermatozóides cumprem suas funções por meio da cauda (motilidade), acrossoma (atividade enzimática preparatória da fecundação) e núcleo (transmissão do patrimônio genético) (MIES FILHO, 1987).

Morfologicamente os espermatozóides podem ser divididos em duas estruturas distintas: a cabeça e a cauda. A cabeça, cuja forma, tamanho e estrutura varia enormemente entre as espécies, contém duas maiores regiões: acrossomal e a pós-acrossomal. Segundo BARTH e OKO (1989) podem ser distinguidas cinco membranas na cabeça dos espermatozóides: a plasmalema, a membrana acrossomal externa e interna e a membrana nuclear interna e externa.

O acrossoma ou capa acrossomal é uma estrutura de dupla camada de membranas que envolvem intimamente o núcleo, situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo. Contém glicoproteínas secretadas pelo retículo endoplasmático e complexo de golgi, que são enzimas responsáveis pela penetração dos espermatozóides no ovócito. Tal estrutura tem sido referida como um lisossomo especializado com função específica de dispersar e dissolver a corona radiata e zona pelúcida do ovócito. Entre outras, a acrosina e a hialuronidase são as enzimas mais importantes na penetração dos ovócitos (YANAGIMACHI, 1994; HAFEZ, 1995),

sendo a hialuronidase, responsável pela expansão da camada intermediária das células do *cummulus oophorus*, e a acrosina envolvida nos estágios iniciais da reação acrossômica, reconhecimento, ligação e/ou penetração dos espermatozóides à zona pelúcida (BARTH e OKO, 1989).

A cauda dos espermatozóides pode ser dividida em quatro regiões distintas: o colo ou peça de conexão, a peça intermediária, a peça principal e peça terminal, todas envolvidas por uma mesma membrana. O colo ou peça de conexão forma uma placa basal que se ajusta dentro de uma depressão na superfície posterior da cabeça. A junção da peça intermediária com a peça principal é feita por um anel denso aderido a uma terminação abrupta da bainha fibrosa. A parte central da peça intermediária possui nove pares de microtúbulos envolvendo dois filamentos centrais (axonema) e circundados por nove fibras grossas ou densas. Recobrendo externamente a peça intermediária estão numerosas mitocôndrias, dispostas em forma de hélice envolvendo as fibras longitudinais da cauda, as quais geram energia necessária para a motilidade espermática. A peça principal, localizada posteriormente ao annulus, se estende até a parte terminal da cauda e é composta centralmente do axonema e associações de fibras grosseiras, que juntas possibilitam os movimentos contráteis da cauda. Finalmente, a peça terminal, posterior à membrana fibrosa, é constituída apenas pelo axonema recoberto pela membrana plasmática (BARTH e OKO, 1989; HAFEZ, 1995).

2.2. Membrana Plasmática dos espermatozóides

A membrana plasmática é o componente estrutural mais externo dos espermatozóides. Embora seja contínua sobre a superfície dos espermatozóides, a sua natureza difere regionalmente. Os dois macrodomínios de superfície (cabeça e cauda), apresentam subdomínios. Os demarcadores entre estes subdomínios são estabelecidos durante o final da espermatogênese e devem ser delineados por estruturas especializadas dentro da membrana plasmática, como o “anel posterior” (junção da cabeça com a peça intermediária) e o “annulus” (entre a peça intermediária e a peça principal) ou, onde relações morfológicas não são aparentes, a delimitação se faz por diferenças nos componentes lipídicos (LADHA et al., 1997). KOEHLER (1985) em estudo sobre domínios da membrana plasmática dos espermatozóides descreve que a estrutura eletrodensa denominada anel posterior, deve servir estruturalmente ou

metabolicamente para isolar a cabeça da cauda dos espermatozóides. Nesta revisão fica claro que a membrana que envolve a cabeça dos espermatozóides é estruturalmente e funcionalmente diferente da que recobre a cauda.

A membrana plasmática é composta de uma bicamada lipídica contendo fosfolipídios, colesterol, glicolipídeos e diferentes tipos de proteínas (ALBERTS et al., 1997).

Três classes principais de lipídios fazem parte das membranas: fosfolipídios (fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina), glicolipídios e colesterol, sendo que dentre estes, os fosfolipídios são os mais abundantes. Estes últimos possuem uma cabeça polar e duas caudas de hidrocarbonetos hidrofóbicas. As caudas usualmente são ácidos graxos e podem diferir em comprimento. Uma cauda geralmente tem uma ou mais duplas ligações *cis* (insaturada), enquanto a outra cauda não as contém (saturada). Diferenças no comprimento e saturação das caudas de ácidos graxos são importantes, porque influenciam a capacidade das moléculas de fosfolipídios de agrupar-se umas às outras, e por essa razão afetar a fluidez da membrana (ALBERTS et al., 1997).

O estado rígido é favorecido pela presença de ácidos graxos saturados porque as caudas hidrocarbonadas retas interagem muito favoravelmente umas com as outras. Por outro lado, duplas ligações produzem flexões nas cadeias de hidrocarbonetos, tornando mais difícil o estabelecimento de uma organização maior entre as cadeias de ácidos graxos de modo que a membrana permanece fluida a temperaturas mais baixas (ALBERTS et al., 1997). A insaturação e o menor comprimento das cadeias lipídicas aumentam a fluidez dos ácidos graxos e, geralmente, lipídios com essas características passam pela fase de transição a temperaturas menores que aqueles com cadeias longas e saturadas (DARNELL et al., 1990).

O conteúdo de colesterol também influencia a fluidez da membrana por tornar a bicamada lipídica menos deformável e conseqüentemente diminuir a permeabilidade da bicamada a pequenas moléculas hidrossolúveis. Apesar do colesterol ter tendência a tornar as bicamadas lipídicas menos fluidas, nas altas concentrações encontradas na maioria das membranas plasmáticas eucarióticas também impede as cadeias de hidrocarbonetos de aproximar-se e cristalizar, desse modo impedindo possíveis transições de fase (ALBERTS et al., 1997).

Embora estejam distribuídos em ambas as fases da membrana, cada tipo de fosfolipídio apresenta preferência por um de seus lados. Fosfatidilcolina e

esfingomielina se localizam na face externa da membrana enquanto a fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol no lado citosólico. Condições como o resfriamento, que alteram a orientação dos lipídios, podem afetar a estabilidade da membrana ou induzir a um rearranjo (fase hexagonal-II) das moléculas formando pontos de fragilidade, promovendo assim, permeabilidade excessiva ou mesmo a ruptura da membrana (AMANN e GRAHAM, 1993). A fase hexagonal – II possui forma cilíndrica, onde as cabeças dos grupos polares dos lipídios voltam-se para o centro e as caudas hidrocarbonadas ficam orientadas para o exterior e constitui a menor forma de agregação lipídica. Essa estrutura fragiliza a barreira de permeabilidade, mas pode ter uma importante função durante a fusão fisiológica de membranas como na reação do acrossoma e a fertilização (HAMMERSTEDT et al., 1990).

A composição proteica das membranas de regiões diferentes varia mais que a composição de lipídios, refletindo a especialização funcional. Além disso, proteínas se encontram adsorvidas na superfície da membrana ou em seu interior fazendo parte da estrutura. As proteínas interligadas com os lipídios são classificadas como integrais ou periféricas. As proteínas integrais são liberadas da membrana apenas por solventes ou detergentes, sendo essenciais para sua estrutura (AMANN e GRAHAM, 1993; LEHNINGER et al., 2000). As proteínas periféricas, por outro lado são solúveis em diluidores seminais e água, sendo facilmente removidas. As proteínas integrais agem como poros ou canais através da membrana, como receptores para outras moléculas ou são encontradas entre as duas bicamadas da membrana (AMANN e PICKETT, 1987; WATSON, 2000).

A membrana plasmática comum apresenta cerca de 50% de sua massa constituída por proteínas. Como os lipídios da membrana, as proteínas freqüentemente têm cadeias de oligossacérideos ligadas à elas. Portanto, a superfície que a célula apresenta para o exterior consiste em grande parte de carboidratos, que formam um glicocálix ou cobertura celular, exercendo função primordial na interação entre esta célula e o ovócito (ALBERTS et al., 1997; AMANN e PICKETT, 1987).

Os efeitos da criopreservação e suas alterações diretas sobre a membrana dos espermatozóides, em diversas espécies são descritas por KROGENAES et al. (1994), MAXWELL e WATSON (1996), HOLT (1997), DEJARNETTE et al. (2000), HOLT (2000), WATSON (2000). Adicionalmente, WATSON (1995) relatam alterações na arquitetura mitocondrial e de núcleo em função dos processos de congelamento e

descongelamento do sêmen, além do acometimento dos eventos de polimerização e despolimerização de proteínas do citoesqueleto dos espermatozóides.

2.3. Mecanismo de lesão celular durante o congelamento/descongelamento dos espermatozóides

A criopreservação do sêmen tomou impulso muito grande na década de 40, após a descoberta, da função crioprotetora do glicerol (Polge 1985, citado por OHASHI, 2001), o que permitiu a congelamento, com sucesso do sêmen bovino. Entretanto, mesmo as melhores técnicas atuais de preservação, alcançam, em média, cerca de 50% de viabilidade da população espermática (WATSON, 1995), dependendo de vários fatores tais como, qualidade do ejaculado, método de congelamento (curva de congelamento), tipo de diluidor, tipo de envasamento (mini-palheta, palheta média, ampola, pellets) e método de descongelamento (AMANN e PICKETT, 1987; OHASHI, 2001), visto que, o processo de criopreservação inclui desde a coleta e diluição do sêmen, até a manutenção da capacidade funcional da célula, por determinado período de tempo, após o descongelamento (WATSON, 1995).

Os principais danos que os espermatozóides sofrem durante a criopreservação são causados pela mudança de temperatura, pela formação de cristais de gelo intracelular e extracelular, desidratação intracelular, alterações na membrana celular como consequência da desidratação e trânsito de moléculas através da membrana durante o descongelamento (AMANN e PICKETT, 1987). WATSON (2000) ainda cita o estresse osmótico e tóxico causado pela exposição dos espermatozóides a altas concentrações de crioprotetores.

Quando os espermatozóides são submetidos ao choque térmico ocorre mudança irreversível que se caracteriza pela perda rápida de motilidade, por movimento anormal (circular ou para trás), danos no acrossoma e na membrana plasmática (aumento na permeabilidade), redução do metabolismo e perda de componentes celulares (GRAHAM, 1996). Estas mudanças ocorrem durante a fase de transição, que se caracteriza pela passagem da membrana plasmática do estágio líquido para o estágio cristalino (fase de gel), devido à alteração na forma das moléculas de fosfolípídios induzidos pelo resfriamento (AMANN e PICKETT, 1987).

Estas alterações impossibilitam os fosfolipídios a moverem lateralmente, resultando na formação de domínio cristalinos, com pequenas regiões de lipídios no estágio líquido onde ficam aderidas as proteínas. Esta agregação protéica resulta no aumento da permeabilidade da membrana e decréscimo da atividade metabólica. Lesões causadas pelo choque térmico podem ser reduzidas pelo resfriamento lento do sêmen e pela adição de meios diluidores.

Se os períodos de resfriamento e equilíbrio forem controlados, os espermatozóides, ao invés de sofrerem choque térmico sofreriam modificações graduais na membrana plasmática e de fluxos iônicos, que confeririam às células maior resistência durante o congelamento. Adicionalmente, os fosfolipídios da gema de ovo (componente do diluidor), interagem com os lipídios da membrana plasmática dos espermatozóides conferindo-lhes maior resistência ao choque térmico e auxílio na preservação da integridade celular, durante a preservação do sêmen (WATSON, 1995).

Os eventos físicos que ocorrem nas células dependem da velocidade de congelamento. Quando o processo de congelamento é muito lento, ocorre a congelamento da água extracelular com a conseqüente concentração de soluto, deixando as células momentaneamente em meio hipertônico, fazendo com que percam água rapidamente, o que induz ao aumento na concentração de soluto intracelular, promovendo a morte celular por desidratação. Por outro lado, quando as células são congeladas rapidamente, não há perda suficiente de água, porém, há formação de cristais de gelo intracelular, causando, conseqüentemente, lesões nas estruturas celulares, fato que compromete a função celular (MAZUR, 1984; WATSON, 1995).

Portanto, é necessária uma curva de congelamento que evite esses dois extremos, ou seja, não muito lenta nem muito rápida, prevenindo, desse modo, que grande número de células sejam afetadas durante o processo. Dependendo da curva de congelamento utilizada, será escolhida a curva de descongelamento. Se os espermatozóides forem congelados lentamente, deverão ser descongelados lentamente para ter tempo de se reidratar. Por outro lado, se foi utilizada uma curva de congelamento rápida, o descongelamento deverá ser rápido, visando impedir o fenômeno da recristalização migratória, que consiste na formação de gelo intracelular a partir de pequenos cristais de gelo que se reestruturam em cristais maiores (migração de cristais) (Leibo e Bradley, 1999, citado por OHASHI, 2001).

Para o congelamento de sêmen bovino, esta curva já está bem definida e consiste basicamente em baixar a temperatura do sêmen a uma velocidade de 0,3 – 0,5°C minuto até o sêmen atingir 4°C, o que se consegue deixando o sêmen, que foi diluído à 32°C, à uma temperatura de 4°C, durante 3 – 4 horas (tempo de resfriamento e equilíbrio), onde o sêmen diluído leva cerca de 90 minutos para atingir a temperatura de 4°C, permanecendo nesta temperatura o tempo restante. Posteriormente, o sêmen é transferido para o vapor do nitrogênio líquido à uma temperatura aproximada de 150°C negativos por 15 minutos e logo após mergulhado em nitrogênio líquido, onde a temperatura é de 196°C negativos, concluindo-se o processo de congelamento (OHASHI, 2001).

A criopreservação promove modificações na membrana plasmática dos espermatozoides, alterando sua permeabilidade e tornando-a mais susceptível a peroxidação lipídica. A diferença de temperatura e osmolaridade entre o meio de congelamento e os espermatozoides promove grande variação no volume de água celular, gerando um mecanismo de estresse na membrana celular. A fase de transição durante o congelamento altera a ultraestrutura da membrana plasmática criando regiões livres de partículas/proteínas, reduzindo sua crioproteção. A reorganização da membrana lipídica dos espermatozoides parece perturbar as integrações lipídio-lipídio ou lipídio-proteína necessárias para o perfeito funcionamento da membrana. Além disso, as alterações na membrana plasmática favorecem a perda de enzimas e cátions, principalmente quando os espermatozoides sofrem choque térmico (frio), levando a danos irreversíveis na motilidade espermática progressiva, atividade metabólica e permeabilidade seletiva ao cálcio. A criopreservação eleva os níveis de cálcio intracelular, assim como a capacitação (WATSON, 2000).

Em consequência da desestabilização das membranas pelo resfriamento ou criopreservação, ocorre a reação acrossômica e capacitação desordenada. As membranas sofrem mudanças na fluidez semelhantes às que ocorrem durante a capacitação, ou seja, tornam-se permeáveis aos íons cálcio, os quais são necessários para a capacitação e reação acrossômica (WATSON, 1995).

2.4. Capacitação Espermática e Reação Acrossômica

Os espermatozóides localizados nos epidídimos são capazes de fecundar, mas, ao entrar em contato com o plasma seminal durante a ejaculação, a membrana plasmática dessas células são recobertas por proteínas (fatores decapacitantes), que provocam alterações metabólicas e bioquímicas em sua estrutura (YANAGIMACHI, 1994). Estas proteínas são denominadas Heparine-Binding Proteins (HBP, ou BSP em bovinos) porque se ligam a heparina. Desta forma, os espermatozóides de mamíferos recém ejaculados são incapazes de sofrer a reação acrossômica e de penetrar no ovócito (GILBERT, 1994).

Para adquirir novamente o potencial de fecundação, os espermatozóides de bovinos precisam passar por uma série de mudanças fisiológicas e bioquímicas no órgão genital feminino, denominadas de capacitação espermática e reação acrossomal (YANAGIMACHI, 1994).

O termo capacitação foi introduzido por Austin em 1952 e refere-se ao fato de que os espermatozóides precisam permanecer no órgão genital feminino por um certo tempo para que sejam capazes de penetrar nos ovócitos (SHAMSUDDIN et al., 1996). A capacitação espermática consiste de um conjunto de alterações (sem mudanças morfológicas visíveis) que envolvem desestabilização da membrana plasmática. Entre essas alterações incluem-se: decréscimo na rigidez da membrana associada com o efluxo de colesterol, redistribuição do conteúdo de fosfolípidios da membrana (PATRAT et al., 2000), aumento na fosforilação da proteína tirosina (BREITBART, 2002), alterações nas glicosaminoglicanas, influxo de íons cálcio (para liberação durante a reação acrossômica), aumento do nível de AMP cíclico e pH intracelular, e modificações de algumas atividades enzimáticas, principalmente a proteína quinase C (PARRISH, 1999).

Todos esses processos desencadeiam uma cascata de eventos bioquímicos que culminam na hiperativação do flagelo e na reação acrossômica (YANAGIMACHI, 1994).

A fluidez da membrana e o estado de capacitação espermática são determinados pela razão colesterol/fosfolípido da membrana plasmática dos espermatozóides (quanto menor a proporção, mais fluida é a membrana). A queda na proporção de colesterol/fosfolípido diminui a microviscosidade, afrouxa o

empacotamento de fosfolipídios na membrana, e permite maior influxo de Cálcio (CROSS, 1998). Além disso, a perda do colesterol permite o aumento do pH intracelular (de 6,7 para 6,92) fazendo com que o acrossoma se torne responsivo. Há elevação dos níveis de bicarbonato intracelular, implicando no aumento da concentração de íons de cálcio e ativação da adenilatociclase (FRESCH e GADELLA, 2000; BREITBART, 2002). Ainda, existem indícios de que a proporção colesterol: fosfolipídios têm influência na duração da capacitação, desta forma, espermatozóides com menor proporção colesterol/fosfolipídio na membrana se capacitam mais rápido (WATSON, 2000).

O processo de capacitação espermática varia quanto à duração (entre espécies, indivíduos e dentro de uma mesma população espermática) e ao local onde ocorre a ejaculação. Nos animais em que a deposição do sêmen se faz na vagina, a capacitação inicia-se na cérvix ou muco cervical e completa-se no útero; se a ejaculação for intra-uterina, o local mais provável seria a tuba uterina (GUERRA e PETERS, 1994). São considerados fatores capacitantes do órgão reprodutor feminino: enzimas, glicosaminoglicanas (GAGs), catecolaminas (por exemplo, epinefrina), taurina e hipotaurina (atuariam modificando o transporte iônico na membrana plasmática).

Durante a capacitação, o acrossoma não sofre alteração morfológica, entretanto a proacrosina é convertida em acrosina pelos GAGs no fluido uterino. Os GAGs podem ser encontrados nas secreções dos órgãos genitais da fêmea e no fluido folicular entre as células do *cumulus oophorus* e a superfície da zona pelúcida; sua composição e concentração variam durante o ciclo estral, sendo mais concentrado no estro que na fase lútea. Os GAGs influenciam na adesão, proliferação, migração e diferenciação celular; induzem a capacitação *in vivo* (modifica diretamente a membrana plasmática e estimula a incorporação de Ca^{2+}) e estimula a atividade da fosfolipase A_2 dentro da membrana, aumentando as concentrações de lisolipídios na membrana, que tornam a membrana instável e mais fusogênica. Entre os GAGs, a heparina é o mais potente em causar capacitação e conseqüente reação acrossômica. Os espermatozóides se ligam à porção sulfato do aminoaçúcar da heparina e a desulfatação da heparina a inativa biologicamente no final da capacitação (COX, 1990).

A reação acrossômica é o estágio seguinte à capacitação e, tem como função básica, permitir que os espermatozóides, ao reagirem, possam penetrar na zona

pelúcida, fundindo-se à membrana do ovócito (YANAGIMACHI, 1994). Este processo, caracteriza-se por pontos múltiplos de fusão entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa. À medida que a reação acrossômica progride, formam-se orifícios que permitem o efluxo de enzimas acrossomais, principalmente acrosina e hialuronidase envolvidas na penetração no ovócito (YANAGIMACHI, 1989). Este processo é chamado de verdadeira reação acrossomal (BEDFORD, 1983; THÉRIEN et al., 1995), e os locais onde estas fusões se iniciam são aquelas onde a membrana acrossomal externa é menos estável e onde há maior quantidade de sítios de ligação para o cálcio (YANAGIMACHI, 1994).

In vivo, a reação acrossômica é induzida por glicoproteínas da zona pelúcida (ZP3) que agem como um ligante para os receptores de membrana plasmática dos espermatozóides. Embora a zona pelúcida seja o principal indutor fisiológico da reação acrossômica, acredita-se que a progesterona, secretada pelas células do *cumulus oophorus* e presente no fluido folicular, também seja importante para o processo de exocitose. Os mecanismos pelos quais a zona pelúcida e a progesterona induzem a reação acrossômica envolvem receptores de membrana plasmática (receptores para ZP3 e para progesterona) e sinais intracelulares mediados pelo aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} (PATRAT et al., 2000).

A ligação da ZP3 com o espermatozóide provoca uma despolarização de sua membrana abrindo os canais para influxo de cálcio, que é um passo essencial para a reação acrossomal nos espermatozóides de mamíferos. Este processo inativa a bomba de sódio-potássio-ATPase, resultando em um aumento do sódio intracelular, promovendo o efluxo do íon hidrogênio, levando ao aumento do pH intracelular (YANAGIMACHI, 1994). Existe, também, um influxo de água com conseqüente aumento da pressão hidrostática, auxiliando o início do processo de reação acrossômica culminando na exocitose do conteúdo acrossomal (SILVA, 1998).

2.5. Métodos de avaliação espermática pós-descongelamento

Para serem férteis, os espermatozóides devem ser capazes de expressar várias características, em uma determinada ordem e tempo. Além disso, número suficiente de

espermatozóides férteis deve estar presente na proximidade dos ovócitos, para ocorrência da fecundação. Sendo que estes devem apresentar pelo menos quatro atributos básicos pós-descongelamento, tais como: metabolismo para produção de energia; motilidade progressiva; enzimas acrossomais intactas, necessárias para a penetração dos espermatozóides através das estruturas que circundam o ovócito; proteínas da membrana plasmática, importante para a sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino e para a junção dos mesmos ao ovócito no momento da fertilização (AMANN e PICKET, 1987).

Por ser uma célula complexa, o espermatozóide se torna infértil quando um dos vários fatores bioquímicos ou morfológicos se encontra afetado. Normalmente, a avaliação de somente um destes aspectos não garante a condição de normalidade dos outros, sendo que a combinação de vários fatores em uma análise multifatorial, seria mais apropriado para diagnóstico da funcionalidade e integridade do espermatozóide (MELO, 1999).

Parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática (número total de espermatozóides móveis, motilidade progressiva e morfologia) têm se mostrado limitados quando a capacidade de prever o potencial de fertilidade do sêmen. Um único teste é pouco eficaz devido ao fato que cada espermatozóide apresenta múltiplos compartimentos subcelulares com diferentes funções a serem avaliadas (SANTOS, 2003).

Além dos parâmetros espermáticos convencionais utilizados na avaliação do sêmen, outros testes vêm sendo utilizados (testes de termo-resistência, teste hiposmótico e teste de reação acrossômica) para identificar e avaliar os fatores que interferem na manutenção de sua integridade física e funcional. Desta forma, a predição da capacidade fecundante de amostras de sêmen pode não ser precisa com a realização de um único teste *in vitro*, porém quando os métodos *in vitro* são usados em conjunto, aumenta-se a acurácia em prever o potencial de fertilidade do sêmen criopreservado (SIKKA, 1996)

O emprego de sêmen congelado/descongelado em programa de IA, que consiste no método de análise *in vivo*, é o melhor método para avaliar se os espermatozóides criopreservados mantiveram essas características e, conseqüentemente, seu potencial fértil (ENGLAND, 1993). No entanto, as análises *in vivo* requerem número grande de animais para serem avaliadas e também dependem do controle de variedade de fatores que vão muito além da qualidade seminal. Entre

esses fatores podem ser incluídos o número de doses/estro e o volume de sêmen ideal para realização da inseminação, bem como o número de inseminações; o local de deposição do sêmen no útero; o momento ideal de inseminação, considerando-se o ciclo estral e fatores individuais dos cães (FARSTAD, 1996).

2.5.1. Características físicas e morfológicas do sêmen

O espermiograma consiste no acompanhamento periódico do número de espermatozóides por ejaculado, motilidade espermática progressiva e morfologia espermática, conjugados com outros exames mais complexos. Torna-se possível à comparação entre vários ejaculados coletados em intervalos regulares e também o estabelecimento de uma curva de produção gamética de um determinado reprodutor. Esse acompanhamento é importante, pois permite o diagnóstico diferencial entre diversas patologias do sêmen como degeneração testicular, hipoplasias, disfunções epididimárias e outros problemas reprodutivos (VALE FILHO, 1982).

Os critérios de avaliação convencional do sêmen congelado seguem os padrões preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (HENRY e NEVES, 1998), onde os reprodutores são selecionados como doadores de sêmen baseado, principalmente, nos aspectos físicos e morfológicos do sêmen. Para o julgamento de sêmen congelado, adotou-se como parâmetros a concentração espermática da dose, motilidade espermática progressiva retilínea, o vigor, o total de espermatozóides anormais e percentuais de defeitos maiores, estes últimos dependentes da concentração de espermatozóides com motilidade progressiva presente na dose (Tabela 1).

A motilidade espermática representa a percentagem de espermatozóides com movimentos progressivos, em cuja avaliação deve-se excluir os espermatozóides com movimentos circulares e vibratórios (OHASHI, 2001). É um processo que requer a maior demanda de energia e apresenta uma correlação positiva com as concentrações de ATP (cuja síntese está associada à capacidade funcional da mitocôndria) (JANUSKAUSKAS e RODRIGUES-MARTINEZ, 1995).

Tabela 1: Padrões para desclassificação de sêmen descongelado de doadores da espécie bovina*

| Parâmetros | Valores |
|---|----------------|
| Volume da dose | < 0,25 mL |
| Motilidade espermática progressiva | < 30,0 % |
| Vigor espermático | < 3,0 |
| Para doses com 10×10^6 ou mais de espermatozóides com motilidade progressiva | |
| Defeitos totais | > 30,0 % |
| Defeitos maiores | > 20,0 % |
| Para doses com 6 a 10×10^6 espermatozóides com motilidade progressiva | |
| Defeitos totais | > 20,0 % |
| Defeitos maiores | > 10,0 % |

* Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal (HENRY e NEVES, 1998).

O vigor é a força do movimento dos espermatozóides que influencia a velocidade de movimentação. Sua avaliação é dada numa escala que vai de zero a cinco, sendo 1 para o ejaculado que apresenta espermatozóides com movimentação fraca e cinco para ejaculados que apresentam espermatozóides com forte movimentação através do campo microscópico (OHASHI, 2001)

A motilidade e o vigor espermáticos são critérios importantes na avaliação da qualidade seminal, pois os espermatozóides precisam estar móveis e obterem hiperatividade, quando na tuba uterina, para alcançar o ovócito e penetrar nas suas camadas de revestimento. Além disso, estes parâmetros são de grande importância e podem revelar, por si só, a existência de distúrbios bioquímicos no sêmen, associados ou não com alterações da espermiogênese (FONSECA et al, 1992). No entanto, mesmo que a estimativa subjetiva da motilidade, em um microscópio de contraste de fase, demonstre repetibilidade, com um mesmo observador, torna-se difícil comparar entre diferentes laboratórios (AMMAN, 1989).

BARTH e OKO (1989) descreveram a importância da morfologia na identificação dos estágios de normalidade da motilidade espermática progressiva e da produção espermática. Para os autores, a qualidade do sêmen por meio do estudo da morfologia das células espermáticas reflete a saúde dos túbulos seminíferos, epidídimos e glândulas anexas.

BLOM (1973) evoluiu o sistema de classificação das patologias espermáticas, dividindo em dois grupos: defeitos maiores e defeitos menores. Neste sistema, os defeitos maiores quando em porcentagens elevadas têm sido relacionados a distúrbios da espermatogênese, podendo ser relacionados quando em alta porcentagem, a alterações da fertilidade ou infertilidade, enquanto que os defeitos menores podem não indicar defeitos na espermatogênese, em geral não afetando a fertilidade desde que não alcancem níveis elevados.

FONSECA et al., (1992) baseado no sistema proposto por BLOM (1973) sugeriram que seja aceito, de cada classe, no máximo 20% de defeitos maiores e menores sendo que o somatório final não deve ultrapassar o máximo de 30% de patologias.

A evidência de relação entre morfologia espermática e fertilidade de touros foi descrita primeiramente por Williams e Savage (1927) citados por vários autores que avaliaram sêmen bovino tanto a fresco quanto criopreservado (RAO et al., 1980; CASAGRANDE e ALMEIDA, 1981; SÖDERQUIST et al. 1997).

Entretanto, diversos autores têm relatado que estes parâmetros, embora importantes, não podem avaliar conclusivamente a capacidade de fecundação do sêmen (AMANN, 1989; FAZELI et al., 1997; RODRIGUES-MARTINEZ et al., 1997), sobretudo quando se avalia o sêmen descongelado e o relaciona com índices obtidos a campo.

2.5.2. Teste de termo-resistência lento em sêmen congelado/descongelado

O teste de termo resistência (TTR) foi proposto por DIMITROPOULOS (1967) para a avaliação da fertilidade potencial de partidas de sêmen congelado de bovino e foi posteriormente, adaptado para as demais espécies. O teste consiste na incubação de uma amostra de sêmen descongelado, em banho-maria, em temperatura e tempo pré-determinados, de acordo com a espécie animal. A motilidade progressiva e o vigor espermático são as características seminais analisadas durante a execução do teste (ZÚCCARI, 1998). De acordo com HENRY e NEVES (1998) o sêmen bovino será considerado de boa qualidade se a amostra submetida ao TTR apresentar ao final do teste pelo menos 15% de motilidade espermática progressiva retilínea e 3 de vigor espermático.

Muitas técnicas foram sucessivamente descritas, levando em consideração a temperatura e o tempo de incubação das células espermáticas. As temperaturas utilizadas pelos diversos pesquisadores oscilam entre 35 a 48°C. Para tempos de incubações mais longos (3 a 28 horas) as temperaturas são geralmente mais baixas. Por outro lado, nos tempos de incubações mais curtos (15 a 60 minutos), são utilizadas as temperaturas mais elevadas (ARRUDA, 1988).

No caso dos bovinos, a grande aceitação do teste, ocorreu em virtude da sua relação positiva e alta, com a fertilidade a campo, observada pela taxa de não retorno aos 60 e 90 dias, com relação de $0,78 \pm 0,04$ (DIMITROUPOLOS, 1967). Diversas pesquisas na espécie bovina sobre a relação existente entre os resultados do TTR e a fertilidade *in vivo* foram realizadas (DIMITROPOULOS, 1967; ARRUDA, 1988; SILVA, 2000). Outros trabalhos também foram desenvolvidos para determinar o tempo do TTR para a espécie equina (ZÜCCARI, 1998); testar diferentes diluidores contendo antioxidante para sêmen bovino (BORGES, 2003); e avaliar sêmen proveniente de animais que foram submetidos a insulação escrotal (BONILLA, 2003).

Adicionalmente, pesquisas com sêmen bovino, demonstraram que alguns fatores influenciam os resultados do TTR devendo, portanto, ser considerados quando da interpretação destes, como: método de congelamento (PICKETT et al., 1961); efeito do ejaculado (PINTO et al., 1978); efeito do reprodutor e do tempo de incubação no teste (Jondet, 1980, citado por ZÜCCARI, 1998) e efeito do meio diluidor (CASAGRANDE e ALMEIDA, 1981).

O teste de termo resistência rápido aplicado na avaliação de sêmen bovino congelado constituiu-se como uma prova de grande aplicabilidade, especialmente por sua correlação com fertilidade a campo. ARRUDA (1988) utilizou sêmen congelado/descongelado, submetido às provas rápida (45°C/ 1hora) e lenta (38° C/ 5 horas) de termo resistência, em fêmeas da espécie bovina, verificando seus efeitos sobre a fertilidade. Resultados satisfatórios foram alcançados nas taxas de prenhez (TTR/R = $0,793 \pm 0,05$ e TTR/L = $0,875 \pm 0,05$), não havendo diferença entre os resultados obtidos em ambos protocolos de avaliação.

Estudo comparativo entre os testes lento e rápido detectou uma correlação de 0,38 e, embora tenha sido constatado que em números absolutos um maior número de amostras era condenado pelo TTR lento, os resultados levaram os autores à conclusão de que o TTR rápido poderia substituir o TTR lento, na avaliação das partidas de sêmen bovino congelado (BARNABÉ et al., 1981a).

Com o objetivo de avaliar a relação entre a taxa de gestação do rebanho, nos regimes de monta natural e inseminação artificial, SILVA (2000) utilizou o TTR para avaliar as características qualitativas de sêmen fresco e congelado/descongelado de touros da raça Nelore. Verificou-se correlação, embora baixa, entre as avaliações do teste de termo-resistência (TTR) e as taxas de gestação nos regimes de monta natural (para sêmen fresco) e inseminação artificial (sêmen congelado/descongelado). De uma forma geral, as correlações simples entre as avaliações do TTR, as patologias espermáticas e o número de espermatozóides aderidos *in vitro* foram baixas e nulas.

CASAGRANDE e ALMEIDA (1981) estudaram a longevidade dos espermatozóides provenientes de partidas de sêmen congelados com meios diluidores diferentes. Nesta pesquisa foram utilizadas 53 partidas de sêmen diluídas em citrato-gema e 62 diluídas com lactose-gema, dos mesmos touros, com o objetivo de se avaliar o TTR lento (38°C/ 5 horas) em função do tipo de diluidor. Observaram que, após 5 horas de incubação, todas as partidas de sêmen diluídas em citrato-gema apresentaram motilidade espermática igual ou acima de 20%. Das partidas diluídas em lactose gema, 34 apresentaram motilidade abaixo de 20%. Assim para o sêmen diluído em citrato-gema, o TTR é perfeitamente aplicável. Entretanto no caso de sêmen diluído em lactose-gema são necessários maiores estudos para a fixação de um valor para o TTR, visto que possivelmente a degradação da lactose leva à formação de substâncias que *in vitro* exercem ação espermatotóxica, colocando em dúvida a validade do teste.

PINTO et al., (1978) estabeleceram uma comparação entre os resultados obtidos com TTR entre animais *Bos taurus* e *Bos indicus*, mantidos em regime de colheitas de sêmen. Estudando 369 amostras (232 *Bos taurus* e 137 *Bos indicus*), observaram que houve variação na freqüência dos resultados, modificando de animal para animal e de colheita para colheita. Determinados animais, embora apresentassem as mais altas porcentagens de células viáveis logo após o descongelamento, tiveram, no entanto, os maiores índices de queda após o TTR. Outros tiveram baixos índices de queda, após o TTR, apesar de não apresentarem altas porcentagens de células vivas após o descongelamento.

A associação entre testes estruturais e funcionais é a tendência para o futuro, pois o objetivo é obter resultados *in vitro* que apresentem alta correlação com as taxas de prenhez. Nesse sentido, objetivando melhorar o controle do potencial de fertilidade do sêmen bovino em exames laboratoriais, o TTR veio oferecer ao técnico mais um

subsídio para garantir, com certa segurança, sobre a liberação de doses industrializadas.

2.5.3. Avaliação da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides (teste hiposmótico)

O teste hiposmótico (teste HO) avalia se a membrana plasmática dos espermatozóides está funcionalmente ativa, característica importante para os vários eventos que acontecem durante a fertilização (capacitação, reação acrossômica e fusão dos espermatozóides com o ovócito) (JEYENDRAN et al., 1984). Portanto, é esperado que quanto mais espermatozóides preservarem esta característica melhor será a qualidade do sêmen (NIE e WENZEL, 2001). Esta técnica caracteriza-se pelo transporte de fluidos através da membrana plasmática intacta dos espermatozóides sob condições hiposmóticas até que o equilíbrio entre os compartimentos seja alcançado. Em solução hiposmótica a célula espermática se expande devido ao influxo de fluidos, predominantemente na região das fibras da cauda. Com o inchaço das membranas, as fibras da cauda dobram-se e enrolam-se, sendo estas alterações facilmente observadas em microscópio de contraste de fase. Os espermatozóides “inchados” ou HO positivo (responsivo ao HO) são classificados como sendo espermatozóides com membrana plasmática intacta (DREVIUS, 1972; JEYENDRAN et al., 1984; INAMASSU et al., 1999).

O teste HO tem sido um dos métodos utilizados para avaliar a integridade funcional da membrana das células espermáticas em várias espécies: humana (JEYENDRAN et al., 1984), caprina (MARTINS, 2001), canina (BUENO, 2000; OLIVEIRA, 2003), suína (VAZQUEZ et al., 1997), eqüina (NEILD et al., 1999; MELO, 1999; NEILD et al., 2000; NIE e WENZEL, 2001; SNOECK, 2003; SANTOS, 2003) e bovina (CORREA e ZAVOS, 1994; REVELL e MRODE, 1994; CORREA et al., 1997 a e b; ROTA et al., 2000; BORGES, 2003).

Apesar de sua relativa simplicidade, vários pontos foram trabalhados para torna-lo um teste de alta confiabilidade e de grande praticidade na execução. Dentre esses pontos, os autores tem discutido fundamentos básicos como a solução ideal a ser utilizada para cada espécie, escolhendo entre sais (citrato de sódio e cloreto de sódio) e

açúcares (frutose e sacarose) em diversas concentrações osmóticas (50 a 300 mOsm/L). Para sêmen congelado/descongelado de bovino foi preconizada por REVELL e MRODE (1994) solução hiposmótica à base de frutose e citrato trissódico com 100mOsm/L.

Além disso, foi estudada a fórmula ideal para ser utilizada como cálculo de formas reativas ao teste HO. Os trabalhos geralmente empregam a fórmula indicada por JEYENDRAN et al. (1984), uma fórmula matemática direta, na qual se multiplica o número de espermatozoides alterados após a incubação por cem, e divide-se pelo total de espermatozoides contados na mesma área. É importante ressaltar que nesse estudo as amostras de sêmen com mais de 5% de espermatozoides com caudas enroladas antes da incubação em meio hiposmótico, não foram utilizadas. CORREA e ZAVOS (1994) e VAZQUEZ et al (1997) utilizaram fórmula de cálculo de formas reativas ao meio hiposmótico, semelhante à de JEYENDRAN et al. (1984), mas subtraíram do valor final a proporção de espermatozoides com cauda semelhante à reativa em uma amostra controle. Contudo, no trabalho de VAZQUEZ et al (1997), esta amostra controle foi originada de incubação em solução isosmótica (300mOsmol/L). Entretanto, MELO (1999) verificou que a incubação em solução isosmótica não induziu a mudanças significativas na morfologia da cauda, o que foi também confirmado por CAIZA DE LA CUEVA et al. (1997). Desta forma, não seria necessário trabalhar na fórmula com sêmen incubado a 300 mOsmol, podendo ser considerado como grupo controle, a própria avaliação do sêmen para morfologia espermática. Com essa fórmula, diminui-se o erro de leitura e interpretação dos resultados, simplificando o teste HO, aproximando-se mais do valor real de formas reativas principalmente se tratando de ejaculados com elevada porcentagem de alterações na região da cauda antes do teste HO (MELO, 1999).

Em sêmen humano, o teste HO vem sendo utilizado com o intuito de ajudar nos problema de infertilidade. Foi desenvolvida uma técnica para selecionar espermatozoides viáveis para injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), baseado no fenômeno de enrolamento da cauda em ambiente hiposmótico modificado. Espermatozoides foram expostos a um meio modificado de solução hiposmótica (para que os espermatozoides permanecessem viáveis após incubação) e então injetado dentro de ovócitos de hamster, avaliando-se desta forma, o efeito do meio sob a fertilização, observando-se descondensação da cabeça do espermatozoide e a formação do pronúcleo masculino (AHMADI, 1997). Em processo semelhante, LIU et

al., (1997) também utilizaram o teste HO para selecionar espermatozóides humanos para injeção intracitoplasmática, utilizada como método de fertilização. Nos dois trabalhos, os autores concluíram que o teste hiposmótico é um procedimento recomendado para a seleção de espermatozóides viáveis em homens apresentando 100% de células imóveis, para procedimentos de injeção intracitoplasmática.

Espermatozóides criopreservados são particularmente susceptíveis a mudanças nas condições osmóticas durante congelamento, descongelamento e processamento. Desta forma, com o objetivo de avaliar os efeitos de várias temperaturas durante o descongelamento e processamento na ocorrência de choque osmótico, funcionalidade da membrana plasmática e viabilidade espermática, CORREA et al. (1996), avaliaram vários métodos de descongelamento de sêmen bovino e concluíram que, embora a recomendação para os processos de descongelamento para espermatozóides criopreservados envolva descongelamento à 37° C por no mínimo 30 segundos (PACE et al., 1981), nesse estudo o melhor método para descongelamento e processamento dos espermatozóides foi 37°C por 10-15 segundos e transferidos para banho Maria à 21°C por 1-2 minutos, demonstrado por maior resposta ao teste HO incubados a 37°C. Isto mostra que a adaptação e transição dos espermatozóides a partir de condições isotônicas pré-congelamento para exposição a condições hipertônicas durante congelamento/descongelamento é menos abrupta em temperaturas abaixo de 37°C, e acima de 21°C. A prevenção ao choque térmico resultou em aumento da resposta ao TESTE HO e a manutenção da integridade funcional da membrana plasmática (CORREA e ZAVOS, 1994). Segundo os autores, pode-se fazer a remoção do glicerol sem aumentar a incidência de choque osmótico e subsequentemente reduzir a integridade da membrana plasmática e sua viabilidade, uma vez que os métodos permitem a transição não abrupta entre ambientes hipertônicos e isotônicos encontrados pelos espermatozóides durante os processos de descongelamento e de fertilização *in vitro*. Resultados semelhantes foram encontrados por CORREA et al. (1997a) para sêmen congelado/descongelado à 37°/21° em diferentes temperaturas de incubação durante o teste HO. Estes autores também concluíram que a descongelamento à 37°C seguida por processamento à 21°C reduz os efeitos negativos associados ao choque osmótico e resulta em prevenção da integridade funcional da membrana plasmática durante a manipulação *in vitro* do sêmen bovino congelado/descongelado.

Várias associações têm sido feitas entre o teste HO e outros parâmetros espermáticos. INAMASSU et al. (1999) relataram em cães, altas correlações entre hiposmótico e patologias espermáticas totais (0,87) e patologia de cauda (0,86), porém baixa com a motilidade espermática (0,14). Esta baixa correlação é explicada pelos autores como sendo devido à especificidade teste HO, pois o edema das células espermáticas é indicativo da integridade e da função das membranas espermáticas, enquanto a motilidade depende não somente do transporte de substâncias que atravessam as membranas, mas também de um grande número de outras funções bioquímicas, como o metabolismo espermático e a ação microtubular das fibras da região da cauda dos espermatozóides.

MELO (1999) observou valores médios de relação entre o teste HO e a motilidade espermática (motilidade total = 0,57%; motilidade progressiva = 0,59). CORREA e ZAVOS (1994) também relataram relação entre percentagem de espermatozóides móveis e espermatozóides com cauda dobrada no teste HO (0,73).

O teste hiposmótico é um teste simples, barato e prontamente aplicável juntamente com os exames de rotina utilizados para se avaliar a fertilidade de touros e os danos de membrana dos espermatozóides induzidos pelos processos de criopreservação, porém, só mensura uma única variável: função da membrana. Desta forma, o teste HO pode dar resultados normais, mas outras anormalidades podem estar presentes, inviabilizando os espermatozóides no processo de fecundação. Por essa razão, o uso do teste HO associado com as avaliações convencionais de sêmen congelado/descongelado tem sido sugerido por CORREA e ZAVOS (1994). VAZQUEZ et al. (1997) concluíram que o teste HO utilizado em conjunto com outros testes de integridade de membrana é importante para a detecção de espermatozóides subviáveis em varrões.

Altas correlações entre teste hiposmótico e fertilidade de amostras de sêmen bovino congeladas/descongeladas foram verificadas em programas de inseminação artificial (REVELL e MRODE, 1994; CORREA et al., 1997b). Entretanto, testes realizados *in vitro*, observaram relações baixas e negativas entre teste hiposmótico de sêmen congelado e fertilidade para sêmen bovino (ROTA et al., 2000), e sêmen fresco de equino (NEILD et al., 2000).

NEILD et al. (2000), para avaliar a relação entre teste HO e fertilidade de sêmen fresco de equino, selecionaram dois grupos de garanhões: os que apresentavam fertilidade aceitável e os que apresentavam fertilidade duvidosa. Os resultados obtidos

mostraram que ganhões com teste HO abaixo de 40% podem ter fertilidade duvidosa. Neste estudo, a relação do teste HO com a motilidade foi alta (0,82), não houve relação com a fertilidade (0,08) embora tenha demonstrado uma tendência à correlação com o número de serviços por gestação (-0,40).

Relacionar os resultados do teste HO, com técnicas de coloração de exclusão e de fluoresceína, para avaliar integridade estrutural e do comportamento da membrana plasmática da cabeça e de diferentes compartimentos do mesmo, frente ao processo de congelamento/descongelamento são processos viáveis que tem sido desenvolvido por vários autores.

DUCCI et al. (2002) avaliaram a resposta do sêmen (fresco) de coelho ao teste HO e sua combinação com corante supravital (HE-teste), avaliando conjuntamente a membrana da cabeça e da cauda espermática. Os espermatozóides tiveram a seguinte classificação: tipo 1: espermatozóides com caudas dobradas e cabeças não coradas = membrana da cauda e da cabeça de boa qualidade; tipo 2: espermatozóides com cauda dobrada e cabeça corada = células com membrana da cabeça danificadas que perderam rapidamente a integridade e permitiram a entrada do corante, embora a membrana da cauda tenha respondido ao estímulo do hiposmótico; tipo 3: cauda reta e cabeça corada = espermatozóides que apresentaram desordem da membrana plasmática, provavelmente devido a morte celular que permitiu a entrada do corante e levou a incapacidade da membrana em responder ao meio hiposmótico; tipo 4: caudas não dobradas e cabeças não coradas = células com membrana da cabeça intactas estruturalmente mas incompetentes funcionalmente no compartimento da cauda. Uma relação positiva foi encontrada entre porcentagem de células tipo 1 e a motilidade progressiva dos espermatozóides logo após a ejaculação e depois da incubação nos períodos de 60 a 120 minutos. Isto ocorre, uma vez que, a motilidade dos espermatozóides também depende de transporte de componentes através da membrana. Os espermatozóides tipo 2 podem ser os responsáveis pela reduzida fertilidade dos ejaculados com altas porcentagens de células móveis. A relação entre a porcentagem de espermatozóides móveis e tipo 1 permite individualizar uma população de espermatozóides que tem alto grau de resistência da membrana tanto da cauda, necessário para o movimento da célula, e o compartimento da cabeça, requerido para o sucesso da fecundação.

CORREA e ZAVOS (1994) após realizar o teste HO, coletaram uma alíquota da solução e misturaram com eosina-nigrosina para verificar a integridade física da

membrana dos espermatozoides que passaram pelo teste HO. Uma relação de 0,81 foi encontrada entre a percentagem de espermatozoides com cauda dobrada com aqueles com membrana intacta.

A relação entre os dois métodos em sêmen humano, embora significativa, é baixa $r= 0,52$ (JEYENDRAN et al., 1984). Possíveis razões para esses comportamentos são a presença no teste HO de espermatozoides de baixa qualidade com membrana íntegra que exibem dobramento, e no teste de eosina de espermatozoides mortos com membranas anatomicamente intactas. Desta forma, pela combinação do corante supravital com o teste HO, os números de falsos positivos podem ser reduzidos (DUCCI et al., 2002).

Sendo assim, a viabilidade espermática é uma questão multifatorial e está vinculada a muitos atributos próprios dos espermatozoides tais como a integridade de seus componentes estruturais e de seu metabolismo. Deve ser lembrado que por se tratarem de compartimentos diferentes, pode-se ter lesão da membrana da cauda enquanto a membrana da cabeça está perfeitamente viável. Alternativamente é possível que algum ponto do procedimento para preservação espermática, resulte em lesão da membrana da cabeça, sem alterar a membrana da cauda, resultando em espermatozoides móveis, mas incapazes de penetrar no ovócito. Desta forma, experimentos vêm empregando a associação de testes *in vitro* diferentes com o objetivo de identificar o grau de associação que se deve esperar entre funcionalidade da membrana plasmática da cauda, avaliada pelo teste HO, e integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça dos espermatozoides, avaliada pelos testes de coloração de exclusão e de fluorescência, além de associar estes achados com os testes convencionais de avaliação de sêmen (ERICSON et al., 1993; SÖDERQUIST et al. 1997; MELO, 1999; SANTOS, 2003; BORGES, 2003; SNOECK, 2003).

2.5.4. Teste de reação acrossômica

A taxa de concepção está na dependência da habilidade dos espermatozoides ejaculados passarem por uma completa modificação de aspectos morfológicos, bioquímicos e biofísicos, se capacitando e culminando com a reação acrossômica quando em contato com a zona pelúcida do ovócito (LENZ et al., 1987; YANAGIMACHI, 1989). Por isso, avaliar a integridade do acrossoma é

imprescindível para determinar a qualidade espermática, isso porque a reação acrossômica precisa estar ocorrendo em sincronismo com o momento da fecundação.

A criopreservação eleva os níveis de cálcio intracelular, assim como a capacitação (GILLAN et al., 1997; WATSON, 2000). Conseqüentemente, a reação acrossomal em espermatozóides provenientes de sêmen congelado/descongelado pode ser realizada em tempo menor que o necessário para sua indução *in natura* nos órgãos genitais da fêmea (O'FLAHERTY et al., 1999; WATSON, 2000). Como as membranas acrossomais podem sofrer lesões durante o processamento do sêmen, faz-se necessário à avaliação de sua integridade para predizer a qualidade do sêmen preservado (PATRAT, et al 2000). Neste sentido, diversos métodos podem ser empregados para avaliação do acrossoma espermático. Citam-se a microscopia de contraste de fase, as colorações específicas para visualização do acrossoma, em microscopia ótica convencional e os marcadores fluorescentes, sendo que cada um dos métodos apresenta fatores positivos e negativos (CROSS e MEIZEL, 1989).

Entre as muitas técnicas de coloração empregadas para se determinar a porcentagem de espermatozóides que sofreram reação acrossomal, estão as que utilizam os corantes Naphtol amarelo e eritrosina B (LENZ et al., 1983) e o azul de Tripán/Giemsa (DIDION et al., 1989).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização e animais do experimento

Este estudo foi realizado na Fazenda São Francisco localizada no município de Magda – SP, situada na região noroeste do Estado de SP, latitude de 20 – 21° Sul e longitude de 50 – 51° oeste, com temperatura média de 24°C, e precipitação pluviométrica anual de 1.189 mm³. As partidas de sêmen foram provenientes da Central de Inseminação Artificial também de propriedade da Fazenda São Francisco.

Foram utilizados 13 touros da raça Nelore, com idades variadas, utilizados na rotina de coleta da central. As partidas de sêmen foram escolhidas em função de sua ampla utilização no programa de inseminação artificial da fazenda. Foram selecionadas aquelas utilizadas com um mínimo de 20 doses de acordo com os registros dos dados referentes à estação de monta da fazenda (15.11.2002 à 15.01.2003). Com base nestes critérios, 23 partidas de sêmen provenientes dos 13 touros, foram selecionadas.

As análises laboratoriais (avaliação física e morfológica do sêmen pós-descongelamento, teste de termo-resistência, teste hiposmótico para avaliação da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides e teste de reação acrossômica) foram realizadas no laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.2. Congelamento de sêmen

Para obtenção dos ejaculados, empregou-se o método de eletroejaculação, onde os touros foram devidamente contidos em tronco apropriado, com auxílio de travas e cinta de proteção, imobilizando-os e protegendo de possíveis lesões traumáticas. Para recepção dos ejaculados nas coletas foram utilizados cones plásticos descartáveis acoplados a tubo coletor previamente aquecidos a 37°C, e envolvidos em capas térmicas.

Imediatamente após a coleta, o tubo coletor foi colocado em banho Maira a 37°C, sendo mantido por todo o processo de avaliação do aspecto físico do sêmen. Após cálculo da concentração espermática por meio de espectrofotômetro, foi adicionado diluente (tris-gema de ovo) necessário para obtenção de proporção 1:1. O volume do diluidor acrescentado para completar a diluição final antes do resfriamento do sêmen foi calculado com base na concentração espermática do ejaculado, sendo que a dose inseminante foi fixada em 25 milhões de espermatozóides/dose.

Após a diluição total, o *erlemeyer* com sêmen diluído foi colocado em um recipiente plástico contendo água do banho Maria (37°C) e dessa forma foi conduzido a câmara fria a 4°C. A curva de resfriamento foi de aproximadamente - 0,55°C/minuto. Os tubos permaneceram na câmara fria por seis horas (tempo necessário ao resfriamento e equilíbrio do sêmen) e, posteriormente foram envasados em palhetas de 0,25mL (previamente impressas com informações sobre o reprodutor, a coleta, a central e o registro da mesma) em máquina apropriada, com capacidade para envasar e lacrar por meio de ultra-som 55 palhetas por minuto. Posteriormente foram colocadas em suportes apropriados com capacidade para 100 palhetas cada. Estas rampas acondicionaram as palhetas de forma individualizada e as mantiveram a uma altura de quatro centímetros da superfície do nitrogênio líquido por período de 14 minutos e posteriormente submersas em nitrogênio. As partidas foram mantidas criopreservadas até o momento de sua utilização.

3.3. Inseminação artificial

As 23 partidas do sêmen congelado foram distribuídas entre os cinco retiros da Fazenda São Francisco. As fêmeas foram submetidas ao máximo de quatro

inseminações pelo método de inseminação trans-cervical (depositando o sêmen no corpo do útero), não havendo posterior repasse com touro em monta natural. A rufiação com buçal marcador foi empregada no auxílio da detecção de estro. O momento ideal para a inseminação foi determinado de acordo com o protocolo de inseminação de TRIMBERG, onde as fêmeas observadas em estro à tarde foram inseminadas na manhã do dia seguinte (7:00 às 8:00 horas) e aquelas em estro pela manhã foram inseminadas no final da tarde do mesmo dia (18:00 às 19:00 horas). A observação do estro teve duração de uma hora para os períodos de observação da manhã e tarde. Cada retiro possuía os técnicos responsáveis (inseminadores) pela observação de estro e inseminação das fêmeas. Quatorze diferentes inseminadores foram identificados e avaliados quanto a sua eficiência neste estudo.

Os critérios de acasalamento das fêmeas para as partidas de sêmen congelado utilizadas respeitaram as orientações zootécnicas, conforme o programa de melhoramento genético estabelecido pela empresa, onde, nem sempre, a mesma partida utilizada na primeira inseminação foi a mesma utilizada nas posteriores inseminações de uma mesma fêmea. Um total de 1.116 fêmeas compôs o experimento, compreendendo todos os “status” reprodutivos: pluríparas (682 fêmeas), primíparas (105 fêmeas) e nulíparas (329 fêmeas), distribuídas aleatoriamente entre os cinco retiros da fazenda, sendo as duas primeiras com bezerro ao pé.

As fêmeas foram mantidas em pastagens formadas por capim braquiária (*Brachiaria decumbens*), onde recebiam mistura mineral à vontade e a água esteve disponível em bebedouros cimentados instalados nos piquetes.

Alguns dos fatores que pudessem interferir nas taxas de gestação das fêmeas inseminadas (inseminador, “status” reprodutivo das fêmeas e retiro) foram consideradas e registradas a partir das anotações de campo das atividades de cada retiro e posteriormente analisadas.

3.4. Taxa de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após o término da estação de monta, por meio de avaliação ultra-sonográfica (ultra-som Aloka, modelo SSD-500 acoplado a transdutor transretal linear de 5MHz), considerando-se gestantes quando visualizada a vesícula ou embrião/feto no lume uterino. A taxa de gestação foi

calculada baseada no número de fêmeas gestantes em função do número de fêmeas inseminadas, multiplicado por 100, sendo referente a cada partida.

3.5. Exames laboratoriais

3.5.1. Avaliação física e morfológica do sêmen congelado/descongelado

Para a avaliação física do sêmen, os seguintes aspectos foram considerados: motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático. As partidas de sêmen foram descongeladas à 37°C por no mínimo 20 segundos e homogêneas em frascos *ependorf* aquecidos à 37°C. Posteriormente, uma gota foi colocada entre lâmina e lamínula previamente aquecida a 37°C (placa aquecedora) para observação da motilidade espermática progressiva retilínea (expressa em porcentagem) e vigor espermático (escala de zero a cinco) avaliando-se a velocidade e a intensidade dos movimentos dos espermatozoides atravessavam o campo microscópico, com aumento de 100 a 400x.

Uma alíquota de sêmen foi acondicionada em um frasco *ependorf* contendo 1 mL de solução formol-salina tamponada (HANCOCH, 1957) para posterior análise de morfologia espermática, com utilização de microscopia de contraste de fase com aumento de 1250x sob objetiva de imersão. Foram avaliadas 400 células e determinou-se o percentual de espermatozoides normais e de anomalias de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda. Posteriormente os defeitos foram classificados de acordo com BLOM (1973) em defeitos espermáticos maiores, menores e totais.

3.5.2. Teste de termo-resistência lento em sêmen congelado/descongelado

A longevidade dos espermatozoides de cada partida de sêmen dos touros utilizados neste experimento foi avaliada pelo teste de termo-resistência lento, de acordo com VOGLER et al., 1991. O teste consistiu em colocar, uma amostra de sêmen de 0,25 mL (uma palheta) previamente descongeladas à 37°C, por no mínimo 20 segundos, em um frasco de *ependorf* de 1,5 mL, e submetê-las a incubação em

banho Maria a 37°C, por três horas, sendo que, a cada 60 minutos (0, 60, 120 e 180 minutos) foram avaliadas quanto a motilidade espermática progressiva retilínea (0 a 100%) e vigor espermáticos (0 a 5) utilizando microscópio com aumento de 100 a 400X. Para classificação das características físicas do sêmen congelado/descongelado, empregou-se os padrões estabelecidos por HENRY e NEVES (1998), embora tenham sido utilizadas partidas de sêmen consideradas inaptas para uso em IA, segundo os referidos padrões.

3.5.3. Avaliação da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides (teste hiposmótico)

O teste hiposmótico (teste HO) foi empregado para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides. Para isso, acrescentou-se 20µL de sêmen congelado/descongelado (37°C por no mínimo 20 segundos) a 1,0 mL de uma solução com frutose e citrato trisódico na concentração de 100 mOsm/L, (Tabela 1 Anexo), previamente aquecida a 37°C. Essa solução foi incubada por 60 minutos a mesma temperatura. Após esse período, as amostras foram fixadas em 0,5 mL de solução de formol-salina tamponada. Posteriormente, uma amostra de 20µL da solução foi colocada entre lâmina e lamínula e feita a contagem de 100 espermatozóides, em microscopia de contraste de fase, em aumento de 1250x sob objetiva de imersão. As células foram classificadas quanto à presença ou não, de cauda dobrada ou enrolada, sendo anotados todos os formatos ilustrados na figura 1. O resultado foi determinado em porcentagem, sendo o cálculo realizado pela seguinte fórmula:

$$\text{HO (\%)} = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HO}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda dos espermatozóides antes do teste HO}) \text{ (MELO e HENRY, 1999).}$$

As alterações na região da cauda dos espermatozóides antes do teste HO foram contadas durante a avaliação dos aspectos morfológicos do sêmen congelado/descongelado.

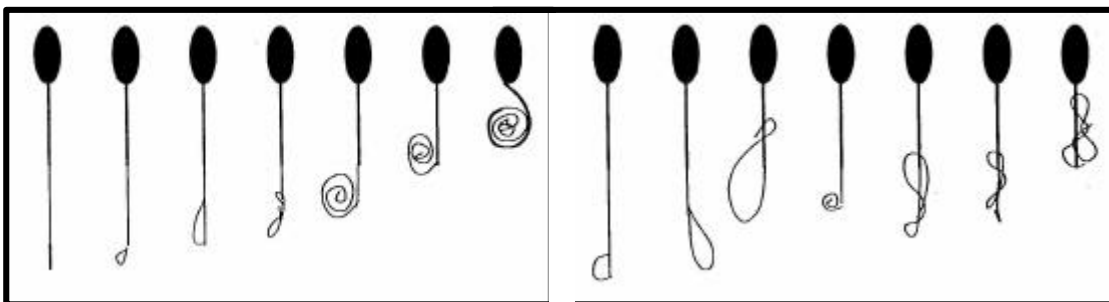


Figura 1: Tipos de dobramento de cauda dos espermatozóides submetidos ao teste HO

3.5.4. Teste de reação acrossômica (Naftol amarelo/eritrozina B)

A reação acrossômica foi avaliada de acordo com o protocolo de coloração adotado por BRYAN e AKRUK (1977). Para isso, três soluções estoques foram preparadas: solução A (0,1% de naftol amarelo em uma solução de ácido acético a 1% em água destilada), solução B (0,2% de naftol amarelo em água destilada) e solução C (0,2% de eritrosina B em água destilada).

As lâminas foram preparadas a partir do esfregaço do sêmen descongelado proveniente das 23 partidas que compuseram este experimento. Logo em seguida foram imersas em solução A por 30 minutos à temperatura ambiente e secas (no lado sem o esfregaço) com papel de filtro. Posteriormente foram lavadas por um período de 10 a 15 segundos em ácido acético a 1% em água destilada, secas ao ar e embebida por 7 minutos em uma solução 1:1 das soluções B e C (ajustando o pH desta mistura para 4,6 a 5,0 com ácido acético). Depois de enxaguadas duas vezes em água destilada com pH 4,6 a 5,0 (também ajustadas com ácido acético), foram secas ao ar, e posteriormente imersas em xileno e imediatamente após, montadas sob lamínula com resina.

Foram considerados espermatozóides com acrossoma normal, aqueles que apresentaram a coloração vermelho-cereja a rosa na membrana acrossomal, e região equatorial bem definida. Por outro lado, foram considerados espermatozóides com acrossoma reagido, aqueles que apresentaram a cabeça corada em rosa menos intenso, e a região equatorial da cabeça dos espermatozóides pouco definida. Foram contados 100 espermatozóides, por partida de sêmen, em microscopia comum com aumento de 1250X, sendo avaliado o percentual de espermatozóides com acrossoma reagido.

3.6. Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa SAEG (UFV, 1998).

Para todas as variáveis estudadas foram efetuadas análises estatísticas descritivas (média, desvio-padrão, coeficiente de variação e frequência cruzada).

A correlação simples de Pearson foi utilizada para verificar relações entre as características estudadas. Foram consideradas correlações de baixa, média e alta intensidade os valores compreendidos entre 0,0 a 0,20; 0,21 a 0,30; e $> 0,30$, respectivamente.

Análise de variância para modelos lineares e comparações entre médias pelo teste de Tukey foram feitas com probabilidade de 5% de erro. Avaliaram-se os efeitos entre touros quanto a motilidade espermática progressiva das partidas de sêmen congelado pós-descongelamento e após 3 horas de incubação à 37°C (TTR), porcentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico e, porcentagem de espermatozóides com acrossoma reagido.

Os dados qualitativos (taxa de gestação) foram agrupados em tabela de contingência e analisadas pelo testes de qui-quadrado com probabilidade de 5%. Os testes foram feitos considerando as partidas de sêmen, touro, retiros da fazenda, inseminadores e status reprodutivo das fêmeas.

Análise de regressão logística (SAS, 1990) foi efetuada no intuito de avaliar os efeitos fixos tais como: efeitos do touro, partida, retiro e inseminadores.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação física e morfológica do sêmen congelado/descongelado

Observa-se na Tabela 2 que todas as características seminais dos animais incluídos neste experimento encontram-se dentro dos padrões de normalidade para a espécie bovina, preconizadas pelo Ministério da Agricultura e Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (HENRY e NEVES, 1998), com exceção das partidas 4 e 6 que apresentaram defeitos maiores e totais acima do recomendado para utilização em programas de Inseminação Artificial, porém usadas em função da estratégia de cruzamento adotado pela fazenda.

A avaliação de sêmen congelado/descongelado envolve determinação da motilidade progressiva retilínea e do vigor espermáticos. Para que taxas de prenhez satisfatórias sejam obtidas, é recomendável que o sêmen apresente uma motilidade progressiva mínima pós-descongelamento de 30% (HENRY e NEVES, 1998), entretanto, variações entre estes valores pós-descongelamento e as taxas de prenhez encontradas na literatura tem sido variadas. No presente estudo, a correlação encontrada entre a motilidade espermática progressiva retilínea pós-descongelamento e a taxa de fertilidade foi negativa e de média intensidade (-0,22) (Tabela 3).

A motilidade espermática é um pré-requisito fundamental para que os espermatozóides alcancem o ambiente uterino e o local de fertilização, e é o critério mais usado na avaliação de sêmen antes e depois do processamento em laboratório. Entretanto, avaliações microscópicas são dependentes de diversos fatores como o meio utilizado para diluir o sêmen, as taxas de diluição, a temperatura e o tempo de

realização durante a avaliação. Porém, a repetibilidade da estimativa subjetiva da motilidade espermática por microscopia de contraste de fase, apresenta bons resultados, quando são feitas pelo mesmo observador, tornando-se difícil comparar os resultados entre diferentes laboratórios (DEN DAAS, 1997).

Tabela 2: Características físicas e morfológicas de partidas de sêmen congelado/descongelado, e taxa de gestação de touros da raça Nelore.

| TOURO | PARTIDA | MOT (%) | VIG | DEFM (%) | DEFME (%) | DEFT (%) | TxG(%) |
|----------------------|---------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| A | 1 | 70 | 3,5 | 10,5 | 6,5 | 17 | 48,15 |
| B | 2 | 45 | 3 | 9,5 | 4 | 13,5 | 84,21 |
| | 3 | 50 | 3 | 8 | 4 | 12 | 77,14 |
| C | 4 | 45 | 3 | 29 | 6,5 | 35,5 | 64,71 |
| | 5 | 45 | 3 | 19,5 | 3 | 22,5 | 72,73 |
| D | 6 | 45 | 3 | 23,5 | 4 | 27,5 | 54,26 |
| | 7 | 50 | 2,5 | 11,5 | 5,5 | 17 | 54,76 |
| E | 8 | 40 | 3 | 8 | 3 | 11 | 71,05 |
| | 9 | 60 | 3 | 7 | 1 | 8 | 60,00 |
| F | 10 | 60 | 3 | 7 | 5 | 12 | 63,64 |
| G | 11 | 40 | 3 | 14 | 6,5 | 20,5 | 62,50 |
| | 12 | 40 | 3 | 14 | 3 | 17 | 57,63 |
| H | 13 | 60 | 3 | 7,5 | 7,5 | 15 | 75,00 |
| | 14 | 65 | 3 | 17,5 | 5,5 | 23 | 64,91 |
| I | 15 | 60 | 3 | 10,5 | 7 | 17,5 | 77,03 |
| | 16 | 40 | 3 | 7 | 4 | 11 | 82,46 |
| | 17 | 40 | 3 | 9,5 | 5,5 | 15 | 69,23 |
| J | 18 | 75 | 3,5 | 11 | 10 | 21 | 64,70 |
| | 19 | 70 | 3 | 19 | 3,5 | 22,5 | 72,41 |
| | 20 | 75 | 3,5 | 12 | 4 | 16 | 41,18 |
| K | 21 | 60 | 3 | 7 | 6 | 13 | 51,72 |
| L | 22 | 45 | 3 | 13 | 4 | 17 | 28,95 |
| M | 23 | 50 | 3 | 11,5 | 5 | 16,5 | 70,83 |
| MÉDIA GERAL | | 53,48 | 3,04 | 12,48 | 4,96 | 17,44 | 63,87 |
| DESVIO PADRÃO | | 11,91 | 0,21 | 5,76 | 1,91 | 6,08 | 13,27 |

MOT (%): Motilidade espermática progressiva retilínea pós-descongelamento, em porcentagem; VIG: vigor espermático classificado em escala de 0-5; DEFM (%): defeitos espermáticos maiores, em porcentagem; DEFME (%): defeitos espermáticos menores, em porcentagem; DEFT(%): defeitos totais, em porcentagem ; TxG (%): Taxa de Gestação, em porcentagem.

Espermatozóides imóveis não são capazes de fertilizar, embora, nem todos os espermatozóides móveis sejam capazes disso, visto que, os espermatozóides podem

apresentar motilidade espermática alta após o descongelamento e não serem férteis, devido a danos em outras estruturas, como o acrossoma, fazendo-se necessário outros testes para as análises do sêmen (DEN DAAS, 1997). SILVA e VERSTEGEN (1995) observaram tal fato, quando congelaram sêmen de cão e notaram que as amostras de sêmen que obtiveram motilidade mais alta, após o descongelamento, não corresponderam às amostras que alcançaram as mais elevadas taxas de prenhez na IA.

CORREA et al. (1997b) não observaram diferença entre motilidade espermática progressiva pós-descongelamento, em touros com baixa e alta fertilidade. O coeficiente de correlação entre a motilidade espermática progressiva e a fertilidade, medida pela taxa de não retorno ao estro, foi de 0,53. Os autores relataram que o percentual de espermatozoides móveis, dentro das características espermáticas estudadas (morfologia normal, porcentagem de acrossoma intacto e espermatozoides reagidos ao teste HO), foi o que obteve a maior correlação com a alta fertilidade observada após a inseminação. CASAGRANDE et al. (1979a) também encontraram correlações significativas (0,34), entre motilidade espermática progressiva e fertilidade, quando utilizaram 191 partidas de sêmen bovino congelado/descongelado.

Quanto aos defeitos espermáticos, alguns autores têm demonstrado seus efeitos sobre a fertilidade a campo. CORREA et al (1997b), avaliando sêmen de bovino congelado/descongelado, verificaram diferença entre a fertilidade e a morfologia espermática (% de espermatozoides normais), onde os menores valores encontravam-se associados ao baixo nível de fertilidade (75,9%) e os maiores ao alto nível de fertilidade (82,2%), apresentando correlação de 0,59. CASAGRANDE et al. (1979b) encontraram correlação negativa entre a patologia total e os defeitos maiores com a fertilidade (-0,48 e -0,51 respectivamente), sendo utilizadas 191 partidas de sêmen congelado em 68 rebanhos de diferentes regiões brasileiras.

Os resultados de correlação obtida no presente estudo entre defeitos morfológicos totais com a taxa de gestação nos regimes de IA foi baixa e negativa (-0,11), como mostra a Tabela 3, discordando dos achados anteriormente citados. Entretanto, são semelhantes ao encontrados por SILVA (2000) para os regimes de monta natural e IA, e por WHITFIELD e PARKINSON (1992) que não observaram diferença entre touros quanto aos defeitos espermáticos maiores e totais e a fertilidade, medida pela taxa de não retorno ao estro após 90 dias da IA.

Tabela 3: Correlações Simples de Pearson da taxa de gestação, com testes complementares de sêmen congelado/descongelado de touros da raça Nelore.

| Parâmetros | r* |
|----------------------------|-------|
| TxG x MOT | -0,22 |
| TxG x DEFT | -0,11 |
| TxG x teste HO | 0,23 |
| TxG x TTR _{T=180} | 0,13 |
| TxG x RA | 0,02 |

* significância (P< 0,05)

TxG: Taxa de gestação; MOT: motilidade espermática progressiva retilínea pós-descongelamento; DEFT: defeitos espermáticos totais; teste HO: células reativas ao teste hiposmótico TTR_{T=180}: teste de termo resistência no tempo 180 minutos; RA: células com acrossoma reagido no teste de reação acrossômica.

Segundo CASAGRANDE et al. (1979b), as partidas consideradas aptas em termos de fertilidade, em sua maioria, apresentaram-se com menos de 20% de patologia total. Contudo, algumas, com até 30% também proporcionaram boa fertilidade. Referindo-se especificamente aos defeitos maiores, aquelas com até 15% alcançaram boa fertilidade. Acima de 20% de defeitos maiores presentes em algumas partidas, de forma sistemática, não demonstraram resultados satisfatórios de fertilidade. Estas considerações não são válidas para os resultados obtidos neste experimento, onde os índices de fertilidade apresentaram baixa correlação (-0,11) com os defeitos espermáticos. Algumas partidas (4, 5, 6 e 19) que apresentaram valores próximos ou maiores que 20%, para defeitos maiores, mostraram boa fertilidade enquanto outras que apresentaram menor percentual de defeitos maiores e totais (1, 12, 20, 21 e 22) mostraram menor fertilidade (Tabela 2).

A fixação de número máximo para patologias espermáticas permissíveis em touros normais, dependendo dos tipos de defeitos apresentados, é muito relativa, podendo ser de grande limitação para o sêmen, ou ser plenamente admissível para uso, objetivando-se níveis de fertilidade satisfatórios. FAZELLI (1996) relata que muitas vezes se verifica amostras de sêmen com aparentes diferenças na fertilidade sem que se verifiquem maiores diferenças de motilidade e morfologia espermática, exceto em casos mais severos. Tal fato assume grande relevância, uma vez que, na grande maioria dos casos, os touros doadores de sêmen têm sido selecionados em caráter intensivo com bases nas características físicas e morfológicas do sêmen. Assim,

observam-se diferenças quanto à fertilidade dentro desta população relativamente homogênea de touros doadores de sêmen.

Muitas vezes, os testes de rotina utilizados, não são suficientes para aferir a taxa de fecundação, visto que as avaliações de sêmen são dirigidas para o enfoque populacional dos espermatozóides. Tal conduta, por si só, induz a erros na predição, pois nem todos os atributos dos espermatozóides (morfologia e habilidade de fecundação) são compensatórios no momento da fecundação (Saacke et al. 1994, citado SILVA, 1998). A importância dos fatores compensatórios na inseminação artificial (aqueles que podem ser contornados com o aumento do número de espermatozóides no órgão reprodutivo feminino) reside no fato de limitarem o número mínimo de espermatozóides necessários por dose para se obter índice de fertilidade máximo (DEN DAAS, 1997).

O número de espermatozóides por dose inseminante afeta a fertilidade (SCHENK et al., 1987). A relação entre o número de espermatozóides inseminados e a taxa de não retorno ao estro tem sido estudada em touros por alguns autores. Esta relação apresenta-se de forma exponencial com um ponto onde mesmo aumentando-se o número de espermatozóides, as taxas de gestação não seriam aumentadas (DEN DASS, 1997).

GERARD e HUMBLLOT (1991) trabalharam com concentrações de 8, 12 e 16 x 10⁶ espermatozóides por dose inseminante, e verificaram resultados significativamente mais baixos entre a primeira e a segunda concentração, após 18.068 primeiras inseminações. FONSECA et al. (1995) utilizaram sêmen com 3 concentrações espermáticas: baixa (5,3 e 5,5 x 10⁶), média (7,8 e 7,6 x 10⁶) e alta (9,2 e 9,0 x 10⁶) com a finalidade de estudar a taxa de gestação em vacas zebus. Os autores também encontraram taxas de gestação mais baixas para a menor concentração (38,52%), quando comparada às concentrações média e alta (51,55 e 49,39%). Estes resultados indicam que aumentar o número de espermatozóides por dose inseminante pode resultar em aumento nas taxas de gestação.

Há variabilidade nos resultados das diversas pesquisas, porém há um consenso em considerar concentrações muito baixas como prejudiciais para a taxa de concepção (FONSECA et al., 1995). Entretanto, alguns estudos indicam que superdose de espermatozóides, por dose de sêmen congelado, somente tem servido para mascarar as correlações da motilidade com a fecundação, e não para aumentar a fertilidade (VALE FILHO, 1989).

A concentração de espermatozóides por dose de sêmen congelado neste estudo (25×10^6) foi similar à recomendada por VALE FILHO (1989) de 15 a 25×10^6 para obtenção de índices satisfatórios de fecundação. Entretanto, a concentração de espermatozóides viáveis também deve ser considerada. FONSECA et al. 1995, revelaram que concentrações abaixo de 6×10^6 espermatozóides viáveis por dose afetam as taxas de concepção. Estes autores consideraram que se se depositar menos que este padrão mínimo, o sistema de transporte não é capaz de fazer chegar à tuba uterina aquele percentual necessário para uma alta taxa de fertilização, e doses inseminantes rarefeitas perdem o seu vigor e os espermatozóides chegam debilitados à tuba, portanto prejudicados para a fertilização. Considerações semelhantes foram feitas por SCHENK et al. (1987) em relação ao número mínimo de espermatozóides viáveis por dose inseminante e concluíram que para manter taxas de fertilização satisfatórias cada dose deve conter concentrações maiores ou iguais a 10×10^6 espermatozóides móveis.

Observando-se os resultados para motilidade espermática pós-descongelamento da tabela 2, pode-se verificar que a menor porcentagem de células viáveis neste estudo foi de 10 milhões de espermatozóides por dose apresentadas pelas partidas com 40% de motilidade espermática progressiva. Desta forma, conclui-se que o número final de espermatozóides vivos foi suficiente para resultados seguros de fertilidade no programa de inseminação artificial. Provavelmente, isso explique a correlação negativa entre a motilidade espermática progressiva das partidas pós-descongelamento e as taxas de gestação encontradas, visto que, o número de espermatozóides viáveis por dose foi suficiente para obter uma taxa de gestação satisfatória.

Os parâmetros espermáticos padrão (motilidade e morfologia) são freqüentemente insuficientes por si só para o diagnóstico de fertilidade/infertilidade, a não ser que, individualmente, estejam muito fora dos valores de normalidade para a espécie. Isso é devido, provavelmente, ao fato da análise visual por microscopia óptica fornecer somente medidas relativamente superficiais da morfologia e motilidade espermática. Além disso, deve-se lembrar que além da morfologia e motilidade normais o processo de fertilização envolve complicados eventos bioquímicos e morfológicos (JEYENDRAN e ZANEVELD, 1993).

4.2. Teste de termo-resistência lento em sêmen congelado/descongelado

Os valores médios da motilidade espermática progressiva retilínea e do vigor espermático pós-descongelamento avaliados durante o TTR estão sumariados na Tabela 4. A média de motilidade espermática para o sêmen congelado/descongelado foi de 53,48% (tempo= 0), 43,69% (tempo=60 minutos), 35,88% (tempo=120 minutos) e 33,04% (tempo=180 minutos).

De acordo com HENRY e NEVES (1998) o sêmen bovino é considerado de boa qualidade se a amostra submetida ao TTR apresentar ao final do teste pelo menos 15% de motilidade espermática progressiva retilínea e 3 de vigor espermático. Considerando os resultados obtidos no tempo 180 do TTR, apenas uma partida foi descartada (partida 7), apresentando motilidade espermática progressiva e vigor espermático de 10% e 1, respectivamente. Neste estudo, apenas os valores para motilidade espermática foram considerados, visto que o vigor não foi classificatório para as partidas de sêmen estudadas.

Observou-se diferença quanto a resistência do sêmen durante o TTR nos tempos 0, 60, 120 e 180 (minutos) para os resultados de motilidade entre as partidas, o que pode ser explicado pelo fato de ter havido variações quanto a congelabilidade do sêmen entre os touros utilizados, ou seja, haviam animais que apresentaram menor resistência do sêmen durante o TTR que outros, ou ainda, problemas de homogeneização do sêmen no momento do envasamento das palhetas durante o processo de congelamento.

Os resultados do TTR, em geral, evidenciaram uma queda gradual dos parâmetros de motilidade espermática, ao longo de 3 horas de duração do teste como demonstra a Figura 2.

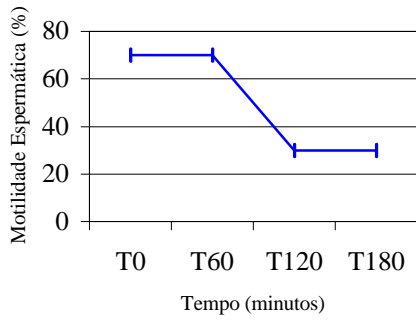
A queda na motilidade espermática progressiva observada ao final do TTR pode ser decorrente da perda de componentes intracelulares ou de lesões estruturais na cauda dos espermatozóides. É possível que a disponibilidade de nucleotídeos cíclicos, envolvidos com a fosforilação oxidativa e com a motilidade espermática, seja insuficiente, embora as mitocôndrias mantenham sua capacidade de produzir energia (HARRISON e VICKERS, 1990).

Tabela 4: Características físicas (motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático) de sêmen congelado/descongelado de touros da raça Nelore, submetidas ao teste de termo-resistência lento (37°C por 3 horas de incubação).

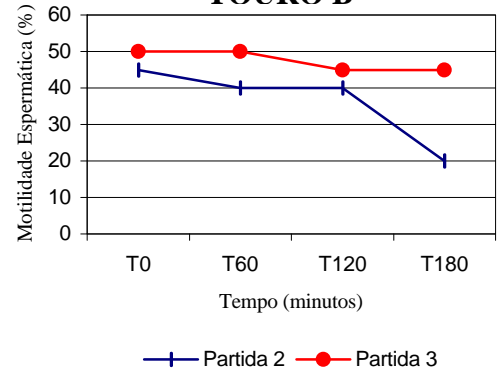
| | | TTR (minutos) | | | | | | | |
|----------------------|----------------|----------------------|-------------|---------------|-------------|----------------|-------------|---------------|-------------|
| | | T = 0 | | T = 60 | | T = 120 | | T= 180 | |
| TOURO | PARTIDA | MOT(%) | VIG | MOT(%) | VIG | MOT(%) | VIG | MOT(%) | VIG |
| A | 1 | 70 | 3,5 | 70 | 3 | 30 | 3 | 30 | 3 |
| B | 2 | 45 | 3 | 40 | 2,5 | 40 | 2,5 | 20 | 2 |
| | 3 | 50 | 3 | 50 | 3 | 45 | 3 | 45 | 3 |
| C | 4 | 45 | 3 | - | - | - | - | 30 | 2 |
| | 5 | 45 | 3 | 30 | 2,5 | 25 | 2,5 | 30 | 2,5 |
| D | 6 | 45 | 3 | 35 | 3 | 30 | 2,5 | 20 | 2 |
| | 7 | 50 | 2,5 | - | - | - | - | 10 | 1 |
| E | 8 | 40 | 3 | 40 | 3 | 30 | 2,5 | 30 | 2 |
| | 9 | 60 | 3 | 60 | 3 | 60 | 3 | 50 | 3 |
| F | 10 | 60 | 3 | 50 | 3 | 30 | 2 | 30 | 2 |
| G | 11 | 40 | 3 | 40 | 3 | 40 | 3 | 30 | 2 |
| | 12 | 40 | 3 | 35 | 3 | 35 | 3 | 35 | 2,5 |
| H | 13 | 60 | 3 | 60 | 3 | 45 | 3 | 40 | 2,5 |
| | 14 | 65 | 3 | 60 | 3 | 40 | 3 | 30 | 2 |
| I | 15 | 60 | 3 | 60 | 3 | 60 | 3 | 60 | 3 |
| | 16 | 40 | 3 | 25 | 3 | 20 | 2 | 20 | 1 |
| | 17 | 40 | 3 | 40 | 3 | 30 | 3 | 30 | 3 |
| J | 18 | 75 | 3,5 | 65 | 3,5 | 40 | 3 | 40 | 2 |
| | 19 | 70 | 3 | 40 | 2,5 | 40 | 2 | 40 | 2 |
| | 20 | 75 | 3,5 | 70 | 3 | 60 | 3 | 40 | 2 |
| K | 21 | 60 | 3 | 45 | 2,5 | 40 | 3 | 30 | 2,5 |
| L | 22 | 45 | 3 | 40 | 3 | 35 | 2,5 | 30 | 2 |
| M | 23 | 50 | 3 | 50 | 3 | 50 | 3 | 40 | 3 |
| MÉDIA GERAL | | 53,48 | 3,04 | 43,69 | 2,67 | 35,88 | 2,5 | 33,04 | 2,28 |
| DESVIO PADRÃO | | 11,91 | 0,21 | 18,6 | 0,87 | 15,57 | 0,86 | 10,74 | 0,58 |

MOT (%): motilidade espermática progressiva retilínea, em porcentagem; VIG: vigor espermático classificado em escala de 0-5; T0: primeira avaliação, logo após o descongelamento; T60: segunda avaliação à 60 minutos; T120: terceira avaliação à 120 minutos; T180: terceira avaliação à 180 minutos de incubação.

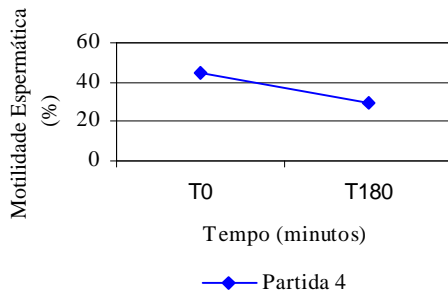
TOURO A



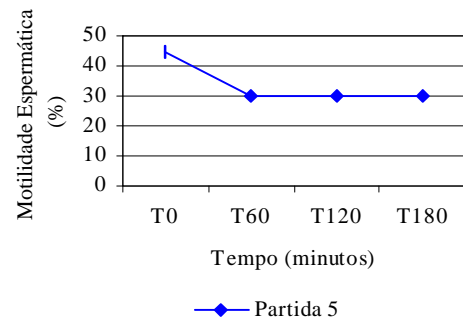
TOURO B



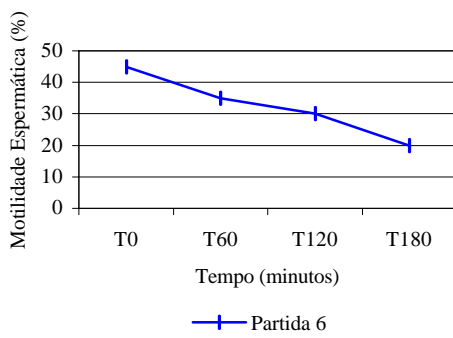
TOURO C



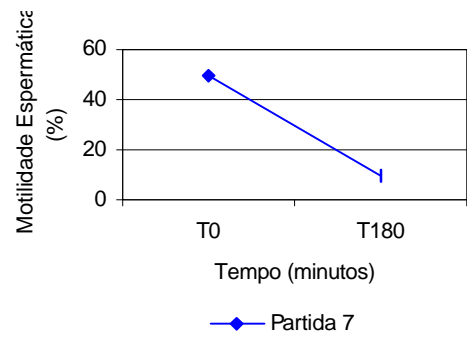
TOURO C



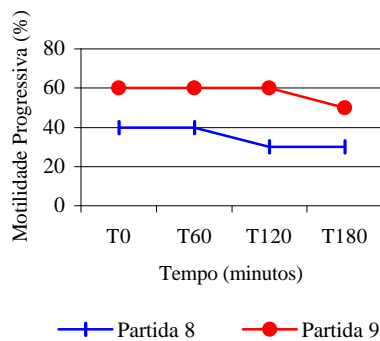
TOURO D



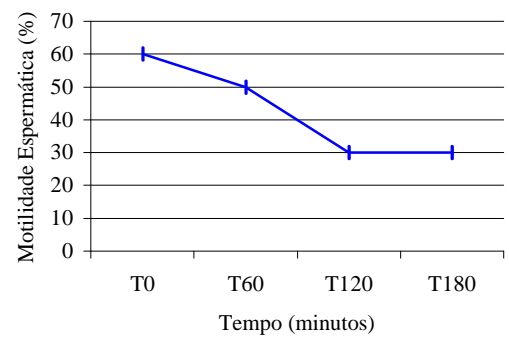
TOURO D



TOURO E



TOURO F



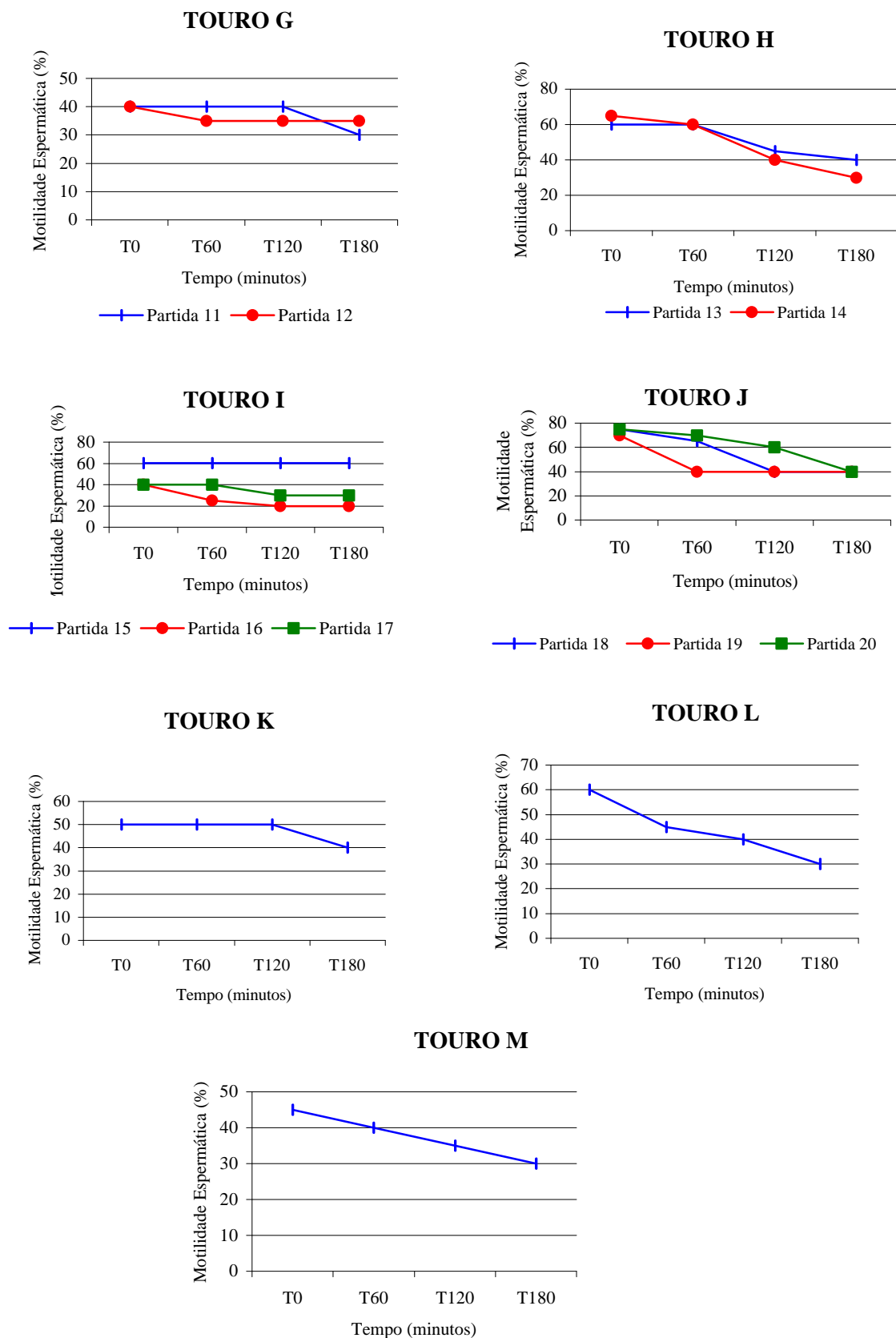


Figura 2: Motilidade espermática progressiva retilínea (%) durante o TTR para amostras de sêmen bovino congelado/descongelado. T0: primeira avaliação, logo após o descongelamento; T60: segunda avaliação à 60 minutos; T120; terceira avaliação à 120 minutos; e T180: quarta avaliação à 180 minutos.

A motilidade espermática é o processo que requer a maior demanda de energia e apresenta correlação positiva com as concentrações de ATP (JANUSKAUSKAS e RODRIGUES-MARTINEZ, 1995). Por essa razão, concentrações de ATP são importantes como indicador de seu potencial metabólico, cuja síntese está associada, à capacidade funcional das mitocôndrias. Assim, uma possibilidade a ser considerada envolve a lesão de organelas como as mitocôndrias e o axonema, durante o descongelamento, com subsequente perda de motilidade, seja diretamente pela alteração do axonema, ou indiretamente em consequência do decréscimo da produção de ATP (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997).

BUENO (2000) quando submeteu sêmen de cão ao TTR, observou que os resultados de motilidade e vigor espermático imediatamente após o descongelamento, tiveram um reflexo positivo sobre o TTR, onde, as partidas que apresentavam maior motilidade após o descongelamento, foram às mesmas que obtiveram maior longevidade durante o teste. Estas características não foram observadas neste estudo, onde, algumas amostras com valores altos de motilidade espermática apresentaram queda acentuada durante o processo de incubação (3 horas) ocorrendo perdas superiores a 50% ao final do teste.

A correlação encontrada para o TTR (tempo=180) e a taxa de gestação, no presente estudo, foi positiva, mas de baixa intensidade (0,13 – Tabela 3).

Pesquisas sobre a correlação existente entre os resultados do TTR e a fertilidade são escassas, no que se refere à espécie bovina (DIMITROPOULOS, 1967; Ludwick et al 1948, citado por BARNABE et al., 1981a; ARRUDA, 1988; SILVA, 2000). No entanto, a grande aceitação do teste ocorreu em virtude da sua correlação positiva e altamente significativa com a fertilidade a campo avaliada por meio da taxa de não retorno aos 60 e 90 dias, com coeficiente de 0,78 (DIMITROPOULOS, 1967) e 0,84 entre fertilidade e longevidade do sêmen a 38°C (Ludwick et al 1948, citado por BARNABE et al., 1981a). Contudo, correlações de alta intensidade não foram observadas em estudo posterior, onde se registraram coeficientes de correlação significativo, variando de 0,35 a 0,40 da primeira à última avaliação do TTR e a taxa de gestação (SILVA, 2000).

Dimitropoulos (1972) citado por BARNABÉ (1981a) observou que, em alguns reprodutores submetidos ao TTR lento, uma baixa percentagem de espermatozoides com movimentos progressivos (5%) resultaram em baixa fertilidade. Entretanto, há reprodutores que nessas mesmas condições, oferecem uma qualidade fecundante

aceitável, de modo que, o autor preconiza a utilização de outros métodos associados à prova lenta para a seleção de partidas de sêmen congelado. Da mesma forma, ROTA et al. (1999) utilizaram sêmen de cão submetido ao TTR (2 horas) e obtiveram 84% de prenhez com amostras de sêmen que apresentaram 17% de motilidade espermática após as 2 horas do teste.

Acredita-se, portanto, que *in vivo*, mesmo as partidas com baixa motilidade, possam interagir no trato reprodutivo feminino com fatores que influenciem, positivamente, sua longevidade.

Um dos fatores que limita a fertilidade do sêmen criopreservado é o período de sobrevivência dos espermatozóides após o descongelamento. Desta forma, o TTR, que tem como princípio avaliar a longevidade dos espermatozóides após o descongelamento é um teste importante, mas deve ser usado criteriosamente e associado a outros testes.

4.3. Integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides (teste hiposmótico)

As formas reativas dos espermatozóides ao teste HO observados neste estudo, estão ilustradas na Figura 3. Observou-se grande variação na resposta dos espermatozóides ao teste HO, fato também relatado por outros autores (JEYENDRAN et al., 1984; NEILD et al., 1999; BUENO, 2000). Diferentes tipos de enrolamento de cauda puderam ser observados, incluindo desde uma pequena curvatura na ponta da cauda até cauda fortemente enrolada, com vários enrolamentos intermediários. CORREA et al. (1997b) também observaram a presença de fases distintas de cauda dobrada/enrolada após o descongelamento de sêmen de bovinos. Esses autores adotaram um sistema de escores (ranqueamento dos espermatozóides) baseado no padrão de dobramento de cauda, com o objetivo de avaliar a relação entre a resposta ao teste HO e a fertilidade de touros, e encontraram maior correlação entre os espermatozóides classificados como tipo A (apresentaram dobramento máximo de cauda em resposta ao teste HO) com a média de fertilidade do sêmen.

O teste HO tem por princípio avaliar a integridade funcional da membrana biológica (transporte seletivo de moléculas), que apenas ocorre de maneira eficiente em células com membrana plasmática íntegras (JEYENDRAN et al., 1984). A membrana celular intacta deve ser vista como requisito essencial mínimo para os espermatozóides, quando se considera que, em contraste com outras células, os mesmos não são capazes de restaurar a membrana plasmática lesionada, visto que, a fluidez da membrana é baixa e os espermatozóides possuem quantidade mínima de citoplasma com organelas ausentes, tornando falha essa capacidade de síntese.

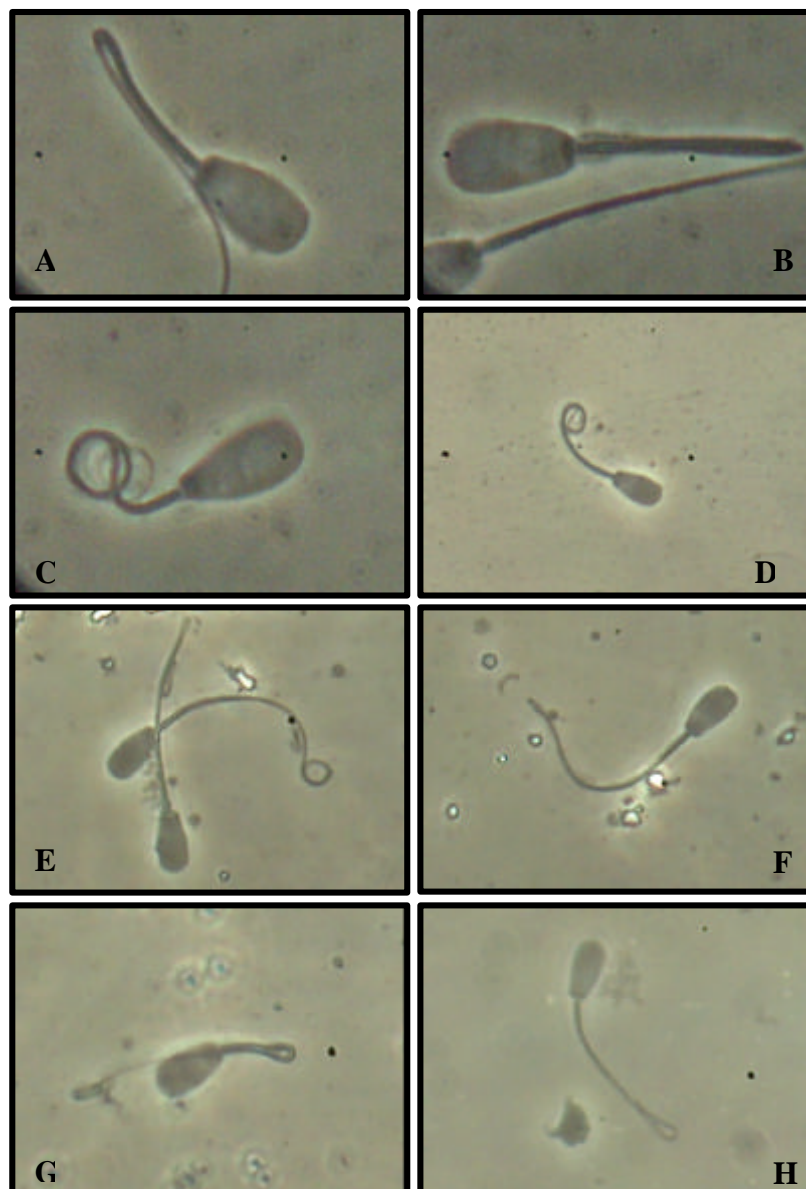


Figura 3: Espermatozóides de bovinos submetidos ao teste HO apresentando vários tipos de dobramento de cauda. Material fixado em formol-salina visualizado em microscopia de contraste de fase sob objetiva de imersão com aumento de 1250X (A, B e C) e de 400X (D, E, F, G e H).

Portanto, naquelas células que já sofreram alguma alteração de membrana, pode-se esperar que a resposta ao teste HO não seja tão eficiente, ou seja, a membrana plasmática vai responder a solução hiposmótica de modo diferenciado (MELO, 1999). Parece que, mesmo os espermatozóides que, após a criopreservação estão aptos a responder ao teste HO, apresentam algum comprometimento da membrana plasmática, o que seria responsável por uma resposta menos eficiente ao teste. Além disso, acredita-se que os filamentos do axonema da cauda podem sofrer flexões de graus diferentes, conforme a quantidade de água que entrou na célula.

JEYENDRAN et al. (1984) descrevem que o influxo de água que ocorre quando os espermatozóides são submetidos ao estresse osmótico, é mais facilmente observado na região da cauda que na cabeça, isso porque a membrana plasmática que envolve a cauda dos espermatozóides é mais frouxamente aderida ou mais maleável que ao redor da cabeça, ou ainda, que o aumento de volume que pode ocorrer nesta região não é freqüentemente observado.

Segundo WATSON (2000) a permeabilidade da membrana varia de acordo com a região dos espermatozóides e a maioria do transporte de água é feito por meio da membrana da cauda dos espermatozóides, sendo essa membrana mais susceptível as alterações.

A porcentagem média de espermatozóides reativos ao teste HO encontradas no presente estudo foi de 37,89 % (Tabela 5), apresentando (com exceção da partida 11), valores inferiores ao de motilidade espermática progressiva, com células móveis que não estavam funcionalmente íntegras.

A baixa resposta ao teste HO após a criopreservação, provavelmente foi em decorrência dos danos que a cauda dos espermatozóides sofreram durante o congelamento/descongelamento, que diminui a capacidade dos espermatozóides reagirem com aumento de volume celular, em resposta à baixa osmolaridade (HOSSAIN et al. 1998), ou pode ser em decorrência das condições de estoque e manuseio do sêmen (CORREA e ZAVOS, 1994). Além disso, o próprio meio de congelamento (hiperosmótico) pode acarretar ruptura de membrana, pois o estresse osmótico pode induzir, além de alterações nas estruturas das membranas, mudanças nas estruturas microtubulares da cauda (CORREA e ZAVOS, 1994).

Tabela 5: Parâmetros espermáticos de sêmen congelado/descongelado com suas respectivas taxas de gestação obtidas de acordo com as partidas de sêmen.

| PARTIDA | MOT (%) | teste HO (%) | RA (%) | IA (n) | GEST (n) | TxG (%) |
|----------------|----------------|---------------------|---------------|---------------|-----------------|----------------|
| 1 | 70 | 32,5 | 8,5 | 27 | 13 | 48,15 |
| 2 | 45 | 41,5 | 10 | 38 | 32 | 84,21 |
| 3 | 50 | 42,5 | 8,5 | 35 | 27 | 77,14 |
| 4 | 45 | 42,5 | 13 | 34 | 22 | 64,71 |
| 5 | 45 | 35,5 | 8,5 | 33 | 24 | 72,73 |
| 6 | 45 | 35,5 | 8,5 | 129 | 70 | 54,26 |
| 7 | 50 | 28,5 | 21 | 42 | 23 | 54,76 |
| 8 | 40 | 37 | 11 | 38 | 27 | 71,05 |
| 9 | 60 | 44,5 | 10 | 35 | 21 | 60,00 |
| 10 | 60 | 45 | 8,5 | 33 | 21 | 63,64 |
| 11 | 40 | 47 | 9 | 48 | 30 | 62,50 |
| 12 | 40 | 38,5 | 15 | 59 | 34 | 57,63 |
| 13 | 60 | 43 | 9,5 | 36 | 27 | 75,00 |
| 14 | 65 | 31 | 8,5 | 57 | 20 | 64,91 |
| 15 | 60 | 59 | 7 | 74 | 57 | 77,03 |
| 16 | 40 | 27,5 | 11 | 57 | 47 | 82,46 |
| 17 | 40 | 22 | 7 | 39 | 27 | 69,23 |
| 18 | 75 | 45 | 7,5 | 85 | 55 | 64,70 |
| 19 | 70 | 35 | 11,5 | 58 | 42 | 72,41 |
| 20 | 75 | 38,5 | 7,5 | 68 | 28 | 41,18 |
| 21 | 60 | 31 | 9,5 | 29 | 15 | 51,72 |
| 22 | 45 | 32,5 | 7 | 38 | 11 | 28,95 |
| 23 | 50 | 36,5 | 9,5 | 24 | 17 | 70,83 |
| MÉDIA | 53,48 | 37,89 | 9,86 | 48,52 | 30,00 | 63,87 |
| DESVIO | 11,91 | 7,91 | 3,11 | 23,65 | 14,93 | 13,27 |

MOT (%): motilidade espermática progressiva retilínea, em porcentagem; RA (%): espermatozóides reagidos pelo teste de reação acrossômica, em porcentagem; teste HO (%): espermatozóides que reagiram ao teste hiposmótico, em porcentagem; IA (n): número de fêmeas inseminadas; GEST (n): número de fêmeas gestantes; TxG: Taxa de gestação, em porcentagem.

Contudo, células funcionalmente íntegras e imóveis também foram observadas (partida 11). WATSON (1995) relata que embora o declínio da motilidade espermática possa ser explicado baseado em mudanças no transporte ativo e permeabilidade da membrana plasmática da região da cauda dos espermatozóides, é também possível que

alterações na energia disponível ou danos aos elementos do axonema possam contribuir para esse declínio, sendo que dessa forma poderia ser esperado resultado de baixa motilidade, sem, contudo encontrar alto índice de lesão da membrana plasmática.

Desta forma, dois aspectos foram considerados sobre a relação entre motilidade progressiva retilínea e integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides. A presença de espermatozóides com membrana plasmática danificada, mas móveis, com possibilidade de se ter células móveis, mas pouco resistentes ao estresse osmótico, e ainda de ter células imóveis, mas que ainda mantinham a integridade funcional da membrana plasmática, não sendo necessariamente a mesma população espermática avaliada nos dois testes de funcionalidade, indicando a complementaridade destes testes para diagnóstico potencial de fertilização, como foi descrito também por MELO e HENRY (1999) e SNOECK (2003) para sêmen eqüino.

Segundo JEYENDRAN et al. (1984), em condições nas quais o teste HO tiver resultados baixos, com menos espermatozóides reativos ao teste, como após o descongelamento, a motilidade espermática, certamente, também estaria diminuída. Entretanto, este fato não foi observado no presente estudo, que não apresentou altas correlações entre a motilidade progressiva retilínea pós-descongelamento e o número de células reativas ao teste HO.

A correlação entre o número de espermatozóides reativos ao teste HO e a motilidade progressiva retilínea pós-descongelamento foi positiva e de média intensidade (0,21) (Tabela 6), o que corrobora os resultados de BORGES (2003) também para partidas de sêmen bovino congelado/descongelado. Entretanto, correlações positivas e de alta intensidade foram encontradas por CORREA e ZAVOS (1994) para sêmen bovino criopreservado e por BUENO (2000) para sêmen de cão, e correlações positivas e de baixa intensidade foram encontradas por NEILD et al. (1999) e SNOECK (2003) para sêmen criopreservado de eqüino, e para INAMASSU (1999) para sêmen fresco de cão.

O edema das células espermáticas é indicativo da função das membranas espermáticas, enquanto a motilidade depende não somente do transporte de substâncias que atravessam as membranas, mas também de grande número de outras funções bioquímicas, como o metabolismo espermático e a ação microtubular das fibras da região da cauda dos espermatozóides. Assim, é importante considerar, que

testes que avaliem características diferentes dos espermatozóides devem apresentar correlações baixas com testes padrões, o que torna o teste mais desejável, indicando que diferente aspecto está sendo medido (JEYENDRAN e ZANEVELD, 1993).

Observou-se correlação alta e positiva entre teste HO e o TTR no tempo 180 (0,64) (Tabela 6). Achados semelhantes foram encontrados por BUENO (2000) para teste HO x TTR no tempo 120 em sêmen criopreservado de cão. Com base nestes resultados, presume-se que espermatozóides com funcionalidade da membrana plasmática após a criopreservação, permaneceram viáveis por mais tempo.

Poucos estudos foram encontrados correlacionando o teste HO com a fertilidade. Neste estudo, foi encontrada uma correlação positiva e de média intensidade (0,23) para espermatozóides reativos ao teste HO e a fertilidade, embora altas correlações para estas variáveis de sêmen bovino congelado/descongelado tenham sido encontradas em programas de inseminação artificial (REVELL e MRODE, 1994; CORREA et al., 1997b). Entretanto, testes realizados *in vitro* (FIV), observaram correlações baixas e negativas entre teste HO de sêmen congelado e fertilidade (ROTA et al., 2000) e teste HO e sêmen fresco de equino (NEILD et al., 2000).

Tabela 6: Correlações Simples de Pearson entre motilidade espermática pós-descongelamento (MOT), células reativas ao teste hiposmótico (teste HO), teste de reação acrossômica (RA) e teste de termo-resistência ao final de 3 horas de incubação (TTR_{T180}).

| Parâmetros | r* |
|--------------------------------|-----------|
| MOT x teste HO | 0,21 |
| MOT x RA | - 0,25 |
| teste HO x TTR _{T180} | 0,64 |
| RA x TTR _{T180} | -0,46 |
| RA x teste HO | -0,22 |

* significância (P< 0,05)

Segundo DEN DASS (1992) a relação entre algumas características seminais avaliadas em laboratório e a fertilidade tem sido inconsistentes. Uma das razões para esta inconsistência tem sido trabalhar com número definido de espermatozóides por inseminação, às vezes tão elevado, sem chances da população espermática, com a

alteração detectada, de influenciar os resultados de fertilidade. Isto pode explicar as baixas correlações encontradas neste estudo, visto que, o número de espermatozóides utilizados por dose foi superior (25×10^6) a dose mínima recomendada para partidas de sêmen congelado-descongelado de bovinos. Além disso, mesmo considerando apenas o número de espermatozóides com membrana plasmática intacta, avaliadas pelo teste HO, têm-se o mínimo de cinco milhões e meio de espermatozóides viáveis para a partida 17 que apresentou apenas 22 % de células íntegras pelo teste HO.

Os espermatozóides são células complexas que se tornam inférteis quando um dos vários fatores bioquímicos ou morfológicos se encontra afetado. Normalmente, a avaliação de somente um desses aspectos não garante a condição de normalidade dos outros, sendo que a combinação de vários fatores em uma análise multifatorial, seria mais apropriado para o diagnóstico da funcionalidade dos espermatozóides (MELO, 1999). Assim, é aceitável que aferições objetivas da motilidade espermática, da funcionalidade da membrana plasmática, condições do acrossoma e outras características do sêmen não estejam, significativamente correlacionadas com a fertilidade. Uma vez que, os espermatozóides férteis devem manter e expressar uma série de características, que incluem desde a estrutura normal de seus componentes funcionais até estabilização de seu conteúdo de DNA, passando pela viabilidade da membrana plasmática. Assim, pode-se supor que todas as características presentes nos espermatozóides férteis não são avaliadas ao mesmo tempo, nas análises *in vitro* do sêmen.

O teste HO é um método simples e aceitável o qual pode ser usado como complemento nas análises de rotina de sêmen. Tem as vantagens somadas de ser menos susceptível aos efeitos imediatos do choque térmico e de avaliar individualmente os espermatozóides em lugar de uma população como um todo, como faz a motilidade espermática progressiva retilínea (NEILD et al., 1999). Entretanto, apesar da relativa simplicidade, pesquisadores tem relatado protocolos diferentes para realização do mesmo e formas diferentes de interpretação dos achados, tornando a comparação das respostas questionáveis, dificultando a interpretação dos resultados. Isso pode explicar a grande variação nas respostas de motilidade versus a porcentagem de espermatozóides reativos ao teste HO, pós-descongelamento, entre pesquisadores (SNOECK, 2003).

4.4. Teste de reação acrossômica (Naftol amarelo/eritrozina B)

Diversas provas laboratoriais têm sido utilizadas para prever o desempenho de partidas de sêmen, visando sua utilização em programas de inseminação artificial. Entretanto, considerando a importante função do acrossoma no processo de fecundação do ovócito, é importante determinar o índice de integridade desse órgão nas amostras analisadas.

A frequência de reação acrossômica neste estudo foi detectada por meio de coloração com naftol amarelo e eritrosina B, onde os espermatozóides com acrossoma reagido apresentaram cor rosa menos intenso na região do acrossoma, e aqueles que não reagiram, a cor vermelho cereja à rosa.

A porcentagem de células reativas ao teste está sumariada na Tabela 5. Foi encontrada média de 9,85% de células com acrossoma reagido para as 23 partidas. A partida 7 (50% de motilidade espermática) apresentou a maior porcentagem de células que apresentaram acrossoma reagido (21%). No entanto, a partida 6 (pertencente ao mesmo touro), que embora tenha apresentado motilidade espermática semelhante (45%), obteve menor número de acrossomas reagidos. Do mesmo modo, partidas com motilidade espermática $\leq 50\%$ (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 16, 17, 22 e 23) apresentaram valores para número de espermatozóides com acrossoma reagido semelhantes às partidas que apresentaram motilidade $> 50\%$ (1, 9, 10, 13, 14, 15, 18, 19, 20 e 21) com valores variando de 7 a 13 %. Isto demonstra que não houve similaridade no que diz respeito à resposta ao teste entre touros e entre partidas ($P < 0,05$).

CORREA et al. (1997b) obtiveram valores semelhantes quando avaliaram a integridade acrossomal de sêmen congelado bovino pelo método Naftol Amarelo/Eritrosina B encontrando valores médios de 78,2% e 83,7% de acrossomas não reagidos para touros de baixa e alta fertilidade, respectivamente.

Observou-se correlação negativa e de média intensidade (-0,25) para o teste de reação acrossômica e a motilidade progressiva espermática pós-descongelamento. Isto demonstra que maiores valores para motilidade pós-descongelamento correlacionaram-se com menores porcentagens de acrossomas reagidos. De certo modo, os espermatozóides podem apresentar motilidade alta, mas não serem férteis devido a problemas relacionados a alterações acrossomais. No entanto, a correlação encontrada entre o teste de reação acrossômica e a motilidade no tempo 180 do TTR

foi negativa e de alta intensidade (-0,46). Ou seja, os espermatozóides que apresentaram acrossomas intactos pós-congelamento apresentaram maior longevidade quando submetidos ao tempo de incubação de 3 horas a 37°C.

Resultados semelhantes foram encontrados por BARNABE et al. (1981b) que inferiram motilidades progressivas menores, associadas a maiores porcentagens de acrossomas anormais, tanto após as provas rápida e lenta de termo-resistência, como em microscopia de contraste de fase e de interferência diferencial, apresentando valores de -0,24, -0,24, -0,35 e -0,21 respectivamente. No entanto, esses autores trabalharam com diferentes patologias de acrossoma pós-descongelamento e não com o teste de reação acrossômica utilizado neste estudo. É importante destacar que os danos acrossomais podem ocorrer independente da motilidade espermática progressiva, porque espermatozóides com movimento podem ser incapazes de fecundar, devido a possíveis alterações de acrossoma que libera antes do tempo as enzimas necessárias para penetração dos espermatozóides nos ovócitos (MENDEZ et al., 1994).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6, correlação negativa e de média intensidade (-0,22) entre o teste HO e o teste de reação acrossômica foi encontrado. Pode-se concluir que maiores valores para número de células positivas ao teste HO correlacionaram-se com menores porcentagens de células com acrossomas reagidos.

JEYENDRAN et al. (1984) observaram correlação alta e positiva entre a porcentagem de espermatozóides capacitados, que penetraram no ovócito desnudo de hamster e a porcentagem de espermatozóides reativos ao teste HO. Os autores propuseram que o teste HO estaria avaliando indiretamente a funcionalidade da membrana plasmática da região da cabeça dos espermatozóides. Mesmo que as membranas da região da cauda e da cabeça do espermatozóide fossem estruturalmente diferentes, parece que o teste HO estaria avaliando também a região da cabeça espermática, devido às altas correlações encontradas entre os testes citados. Esses resultados mostram regiões de susceptibilidade diferentes dos espermatozóides, indicando menor resistência ao estresse osmótico avaliado pela funcionalidade da membrana plasmática da cauda frente à incubação em solução hiposmótica, comparada à resistência da membrana da cabeça. Esses dados vêm a confirmar que a funcionalidade da membrana da cauda, não é um indicativo absoluto da integridade

estrutural da membrana da cabeça, sendo estes testes complementares e não excludentes.

Não foi encontrada correlação ($P > 0,05$) entre o teste de reação acrossômica e a taxa de fertilidade das partidas analisadas. CORRÊA et al. (1997b) obtiveram correlação de 0,52 entre porcentagem de acrossomas intactos e a fertilidade dos touros (média entre baixa e alta fertilidade). A maior correlação entre porcentagem de acrossomos inalterados e fertilidade de sêmen bovino congelado foi observada após 2 e 4 horas de incubação a 37°C (0,60 e 0,58) (Saacke e White, 1972, citado por BARNABÉ et al., 1981). Como a fertilização envolve vários processos espermáticos, parece ser plausível afirmar que a maneira mais eficiente de predizer a fertilidade dos reprodutores seja pela combinação de testes de função espermática, com alguns mais eficientes que outros.

A verdadeira reação acrossomal envolve múltiplas fusões entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática dos espermatozóides, permitindo que o conteúdo do acrossoma escape através da membrana fenestrada (THÉRIEN et al., 1995). Entretanto, enzimas hidrolíticas permitem que a membrana acrossomal externa seja destruída (digerida) ou destacada do corpo dos espermatozóides mortos ou moribundos, assemelhando-se àqueles que sofreram ou estão sofrendo reação acrossômica. Este processo é conhecido como falsa reação acrossomal sendo necessário distingui-lo da verdadeira reação acrossomal, que ocorre fisiologicamente nos espermatozóides vivos e móveis (YANAGIMACHI, 1994).

Fisiologicamente, apenas espermatozóides capacitados são capazes de sofrer reação acrossômica. Da mesma forma, quando os espermatozóides são congelados, parte das mudanças na membrana plasmática que acontecem fisiologicamente com a capacitação acontece devido à transição de fase da membrana plasmática e ao estresse osmótico sofrido pelas células. Assim, espermatozóides bovinos podem capacitar e sofrer a reação acrossômica facilmente após o processo de congelamento/descongelamento (DEN DAAS, 1997). Do mesmo modo que a membrana plasmática, as membranas acrossomais também podem sofrer lesões durante o processamento do sêmen (WATSON, 1995). Espermatozóides podem perder seus acrossomas quando morrem (reação acrossômica falsa), e quando se estuda a criopreservação a avaliação deste tipo de perda acrossomal é usada amplamente para avaliar danos às células (CROSS e MEIZEL, 1989).

A conseqüente desestabilização das membranas, pelo processo de criopreservação, sendo responsável pela reação acrossômica prematura dos espermatozóides, tem sido responsabilizada pela queda da viabilidade dos espermatozóides e redução de sua fertilidade, após inseminação transcervical (WATSON, 1995). Clarke e Jhonson 1987, citados por WATSON (1995) verificaram aumento na proporção de espermatozóides de bodes, com acrossomas reagidos no pós-descongelamento entre a população selecionada pelo “swim-up”. Os autores observaram que estes espermatozóides penetraram no ovócito por meio de FIV imediatamente após o descongelamento sem nenhum período de incubação preparatório.

A avaliação microscópica das alterações espermáticas induzidas pelo processo de criopreservação em diversas espécies tem sido extensivamente utilizada em muitos estudos no sentido de melhorar a visualização principalmente dos danos acrossomais. KROGENAES et al. (1994) observaram defeitos de acrossoma logo após o descongelamento. Lesões de acrossoma caracterizados pela extensa vesiculação e descontinuidade do plasmalema e da membrana acrossomal externa foram observadas.

A técnica de coloração Naftol Amarelo, foi usada por alguns autores (PARRISH et al., 1988; STEINHOLT et al., 1991; CHRISTENSEN et al., 1994) para avaliação do acrossoma. Contudo, seu uso isoladamente pode induzir a erros de estimativa, visto que as células mortas que sofrem lise acrossomal, coram-se como as células vivas que sofreram RA chamada de verdadeira. Esta técnica não permite distinguir os espermatozóides vivos dos mortos, desta forma, os espermatozóides reagidos e que conseqüentemente não estavam aptos a fecundar o ovócito, poderiam pertencer à população de espermatozóides mortos e não poderiam ser considerados para correlação com a fertilidade. Por isso, torna-se essencial a determinação da viabilidade celular, por meio de outra técnica de coloração, ou com o uso de uma coloração que possa avaliar tanto a viabilidade quanto a integridade do acrossoma.

4.5. Taxa de gestação

Os resultados serão discutidos com base no teste Qui-quadrado, visto que, as análises de regressão logística apresentaram resultados semelhantes. Os valores

referentes à taxa de gestação de acordo com as partidas encontram-se na Tabela 7. Observou-se diferença ($P < 0,05$) pelo teste Qui-quadrado entre as partidas estudadas.

O melhor resultado obtido, entre as partidas estudadas, para taxa de gestação, foi 84,21% (partida 2) que apresentou valores semelhantes ($P > 0,05$) aos das partidas 3, 13, 15, 16 e 19 (77,14; 75; 77,03; 82,46; 82,46 e 72,41%, respectivamente). A menor taxa de gestação foi obtida para a partida 22 (28,95%), sendo semelhante apenas às partidas 1, 20 e 21 que também apresentaram baixos valores para a taxa de gestação (48,15; 41,18 e 51,72%, respectivamente). É interessante observar que estas partidas apresentaram alta porcentagem de motilidade espermática progressiva pós-descongelamento (70, 75 e 60%, respectivamente para as partidas 1, 20 e 21), associadas a alta concentração de espermatozóides viáveis por dose ($17,5 \times 10^6$, $18,75 \times 10^6$ e 15×10^6 , respectivamente). Assim, provavelmente, os baixos índices de fertilidade encontrados poderiam ter acontecido devido às condições inerentes de cada serviço, como qualidade do pessoal, outras características do sêmen, qualidade da tecnologia de congelamento empregada e qualidade do rebanho. Entretanto, de acordo com os resultados avaliados neste estudo, acredita-se que estes fatores não influenciaram as taxas de gestação.

Apesar da partida 22 ter apresentado menor taxa de gestação, é importante considerar que, das 38 inseminações onde foi utilizada, resultou em 11 fêmeas gestantes e 27 não gestantes ao final da estação de monta (Tabela 2 ANEXO). Com base nestes dados, observou-se que das 27 fêmeas não gestantes, 14 não apresentaram estro após a inseminação, o que nos leva a pensar que pode ter ocorrido falha do inseminador no momento da detecção do estro, ou até mesmo que a vaca concebeu, mas não manteve a gestação decorrente de uma perda embrionária precoce.

A falha na fertilização ou morte embrionária pode ser ocasionada pelo manejo inadequado dos animais (BRUYAS et al., 1993). Como manejo inadequado, pode-se considerar a influência do estresse térmico sobre a taxa de concepção. Em vacas estressadas pelo calor a atividade fisiológica é diminuída e, provavelmente, este seja, o responsável em parte pelo aumento nas perdas de estros observados durante os meses mais quentes.

TABELA 7: Taxa de gestação obtida por partida de sêmen de touros da raça Nelore.

| P | TxG (%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|
| 1 | 48,15 | a | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 84,21 | b | c | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 77,14 | b | c | e | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 64,71 | a | c | e | g | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 72,73 | a | c | e | g | i | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 54,26 | a | d | f | g | i | k | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 54,76 | a | d | f | g | i | k | m | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 71,05 | a | c | e | g | i | k | m | o | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 60,00 | a | d | e | g | i | k | m | o | q | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 63,64 | a | d | e | g | i | k | m | o | q | s | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | 62,50 | a | d | e | g | i | k | m | o | q | s | u | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 57,63 | a | d | e | g | i | k | m | o | q | s | u | x | | | | | | | | | | | |
| 13 | 75,00 | b | c | e | g | i | l | m | o | q | s | u | x | y | | | | | | | | | | |
| 14 | 64,91 | a | d | e | g | i | k | m | o | q | s | u | x | y | α | | | | | | | | | |
| 15 | 77,03 | b | c | e | g | i | l | n | o | q | s | u | w | y | α | χ | | | | | | | | |
| 16 | 82,46 | b | c | e | g | i | l | n | o | r | t | v | w | y | β | χ | ε | | | | | | | |
| 17 | 69,23 | a | c | e | g | i | k | m | o | q | s | u | x | y | α | χ | ε | γ | | | | | | |
| 18 | 64,70 | a | d | e | g | i | k | m | o | q | s | u | x | y | α | χ | φ | γ | ι | | | | | |
| 19 | 72,41 | b | c | e | g | i | l | m | o | q | s | u | x | y | α | χ | ε | γ | ι | κ | | | | |
| 20 | 41,18 | a | d | f | h | j | k | m | p | q | t | v | x | z | β | δ | φ | η | φ | λ | μ | | | |
| 21 | 51,72 | a | d | f | g | i | k | m | o | q | s | u | x | y | α | δ | φ | γ | ι | κ | μ | π | | |
| 22 | 28,95 | a | d | f | h | j | l | n | p | r | t | v | w | z | β | δ | φ | η | φ | λ | μ | π | θ | |
| 23 | 70,83 | a | c | e | g | i | k | m | o | q | s | u | x | y | α | χ | ε | γ | ι | κ | v | π | ω | |
| M | 63,87 ± 13,27 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

P: número de partidas; TxG (%): Taxa de Gestação, em porcentagem; M: média geral

$X^2 = (P < 0,05)$; $GL_1 = 3,84$

a, b...z = Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si.

A taxa de gestação mostrou-se afetada pela eficiência dos inseminadores ($P < 0,05$, Tabela 8), embora tenha apresentado resultados satisfatórios. Os inseminadores 5 e 11 apresentaram os melhores resultados (80,36 e 78,05%, respectivamente). Enquanto o inseminador 5 apresentou semelhança apenas com os inseminadores 2, 3 e 11 (70,97, 73,02 e 78,05% respectivamente), o inseminador 11 foi semelhante aos inseminadores 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 12 (70,97, 73,02, 62,75, 80,36, 62,45, 62,93 e 62,96% respectivamente). Diferindo destes, com menores taxas de gestação, encontram-se os inseminadores 1, 7, 9 e 10, que obtiveram para taxa de gestação valores de 56,9, 60,26, 57,46 e 57,14%, respectivamente.

Tabela 8: Taxa de gestação por inseminador alcançada em estação reprodutiva de rebanho de fêmeas da raça Nelore*.

| INS | IA (n) | GEST(n) | TxG (%) | |
|--------------|-------------|------------|---------------|-----------------|
| 1 | 58 | 33 | 56,9 | a |
| 2 | 31 | 22 | 70,97 | a |
| 3 | 63 | 46 | 73,02 | a d |
| 4 | 51 | 32 | 62,75 | a d f |
| 5 | 56 | 45 | 80,36 | b d g h |
| 6 | 237 | 148 | 62,45 | a d f i |
| 7 | 151 | 91 | 60,26 | a d f i k |
| 8 | 116 | 73 | 62,93 | a d f i k |
| 9 | 134 | 77 | 57,46 | a e f i k n |
| 10 | 63 | 36 | 57,14 | a d f i k n P |
| 11 | 41 | 32 | 78,05 | b d f h l o Q r |
| 12 | 108 | 68 | 62,96 | a d f i k n P r |
| 13 | 1 | 0 | 0 | - - - - - - - - |
| 14 | 1 | 1 | 100 | - - - - - - - - |
| TOTAL | 1111 | 704 | 63,37% | |

* considerados apenas os inseminadores registrados nas anotações de campo de cada retiro
 INS: Inseminador; IA (n): número de fêmeas inseminadas; GEST (n): número de fêmeas gestantes; TxG (%): taxa de gestação em porcentagem.
 $X^2 = (P < 0,05)$; $GL_1 = 3,84$, com exceção do 13º e 14º inseminadores, que foram excluídos da análise.
 a, b...r = Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si.

Apesar das diferenças verificadas neste estudo, pode-se concluir que os resultados foram pouco influenciados pela eficiência dos inseminadores. Este fato pode ser confirmado pela evolução de prenhez evidenciada na Tabela 9, onde 61,75;

67,18 e 72,92% das fêmeas ficaram gestantes nos 1º, 2º e 3º serviços respectivamente. Além disso, os índices de serviço encontrado foram de 1.62, 1.49 e 1.37, considerados bons quando se considera o ideal para sêmen nacional de 1.5 (PORTO et al., 1993).

Alguns autores têm enfatizado a correta observação de estro como essencial para não proporcionar elevação no período de serviço, notadamente em fêmeas zebuínas onde a detecção torna-se difícil em razão da menor duração e intensidade do estro (VALLE et al., 1996). Em grandes rebanhos, quando as condições de estresse são baixas, a alimentação é adequada e a detecção de estro é feita por observação de pelo menos 30 minutos três vezes ao dia, são obtidas de 70 a 80% de identificação de estro. Porém, de acordo com a eficiência na detecção do estro pelo inseminador estes valores podem cair para menos de 50%, considerando as mesmas condições (SENGER, 1994). Além disso, falhas na interpretação dos sinais de estro também podem contribuir para a baixa fertilidade dos animais inseminados. Isto pode ser demonstrado utilizando-se métodos de análise de progesterona no sangue e no leite, que têm mostrado variação de 5 a 30% de animais inseminados sem estar em estro no momento da IA (ALVAREZ, 1990). Outro aspecto associado à repetição de serviços refere-se ao local de deposição correta do sêmen no corpo uterino, onde os animais com alterações morfológicas de cérvix possuem menores chances de fecundação (BARTH, 1993, BRUYAS et al., 1993). Acredita-se que estas observações não são válidas para este estudo, visto que, o tempo determinado para observação do estro (sistema de TRIMBERG) foi eficiente para detectar o estro dos animais, refletido nas taxas satisfatórias de prenhez encontradas.

Bons resultados foram encontrados neste estudo quanto à repetição de serviço. Analisando a tabela 9, pode-se observar que 32,75% das fêmeas (262/800) repetiram estro após o primeiro serviço e 18,3% (48/262) após o segundo serviço. Além disso, não foi encontrada diferença ($P > 0, 05$) pelo teste de Qui-quadrado quanto ao número de serviços (Tabela 9) em relação à fertilidade, que apresentaram valores de 61,75, 67,18 e 72,92% para primeiro, segundo e terceiro serviços respectivamente. O quarto serviço não foi considerado na análise, uma vez que apenas seis fêmeas foram inseminadas nestas condições.

Tabela 9: Taxa de gestação por serviço alcançada em estação reprodutiva de rebanho de fêmeas da raça Nelore.

| SERVIÇO | IA (n) | GEST (n) | TxG (%) | |
|--------------|-------------|------------|---------------|-----|
| 1 | 800 | 494 | 61,75 | A |
| 2 | 262 | 176 | 67,18 | A a |
| 3 | 48 | 35 | 72,92 | A a |
| 4 | 6 | 2 | 33,33 | - - |
| TOTAL | 1116 | 707 | 63,35% | |

IA (n): número de fêmeas inseminadas; GEST (n): número de fêmeas gestantes; TXG (%): taxa de gestação em porcentagem. 1: primeiro serviço; 2: segundo serviço; 3: terceiro serviço; 4: quarto serviço.

$X^2 = (P < 0,05)$; $GL_1 = 3,84$, com exceção do 4º serviço, que foram excluídos da análise.

a = Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si.

Em relação aos cinco retiros da fazenda, foram encontradas diferenças significantes entre os retiros 1, 3 e 4 ($P < 0,05$) (Tabela 10), embora os retiros 4 e 5 tenham apresentado semelhança entre si, sendo o retiro 1, o que apresentou melhor taxa de gestação (79,17%). Embora as taxas de gestação tenham apresentado bons resultados, acredita-se que alguns fatores relacionados ao retiro (estresse dos animais no momento da inseminação) podem ter influenciado na diferença encontrada.

Tabela 10: Taxa de gestação por retiro alcançada em estação reprodutiva de rebanho de fêmeas da raça Nelore.

| RETIRO | IA (n) | GEST (n) | TxG (%) | |
|--------------|-------------|------------|---------------|-------|
| 1 | 72 | 57 | 79,17 | a |
| 2 | 5 | 2 | 40,00 | - - - |
| 3 | 214 | 104 | 48,60 | b c |
| 4 | 468 | 305 | 43,14 | b d e |
| 5 | 357 | 239 | 66,95 | b d e |
| TOTAL | 1116 | 707 | 63,35% | |

IA: número de fêmeas inseminadas; GEST: número de fêmeas gestantes; TXG: taxa de gestação em porcentagem.

$X^2 = (P < 0,05)$; $GL_1 = 3,84$, com exceção do retiro 2, que foi excluído da análise.

a, b...e = Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si.

Quanto ao manejo do rebanho, considerando o status reprodutivo das fêmeas, sabe-se que a importância da disponibilidade e qualidade de pastagens durante a estação seca, proporcionando melhor condição nutricional às novilhas que se

tornaram prenhez e às novilhas de 1ª cria. Conseqüentemente, as novilhas paridas (primíparas) apresentam menor desgaste orgânico, favorecendo o aparecimento do primeiro estro fértil e as novilhas a serem liberadas para estação reprodutiva atingem mais rapidamente a condição corporal desejada.

Neste estudo, não houve diferença ($P > 0,05$) pelo teste de Qui-quadrado quanto ao status reprodutivo das fêmeas (Tabela 11) em relação à fertilidade, obtendo valores de 61,44%, 68,57% e 65,55% para pluríparas, primíparas e nulíparas respectivamente.

Resultados semelhantes foram encontrados por FONSECA et al. (1995), onde a categoria das fêmeas também não influenciou no resultado final de fertilidade. Em princípio, a categoria “plurípara” deveria apresentar resultado inferior, devido ao peso dos efeitos negativos da cria ao pé sobre a eficiência reprodutiva. Entretanto, as ótimas condições de manejo a que o rebanho esteve submetido durante a estação de monta, provavelmente, minimizaram esta hipótese e acarretaram nivelamento de todas as categorias no mesmo patamar de fertilidade.

Tabela 11: Taxa de gestação de acordo com o status reprodutivo de fêmeas da raça Nelore.

| STA/REPRO | IA (n) | GEST (n) | TxG (%) | |
|------------------|---------------|-----------------|----------------|-----|
| PLURÍPARA | 682 | 419 | 61,44 | a |
| PRIMÍPARAS | 105 | 72 | 68,57 | a a |
| NULÍPARAS | 329 | 216 | 65,65 | a a |
| TOTAL | 1116 | 707 | 63,35% | |

STA/REPRO: Status Reprodutivo da fêmea; IA (n): número de fêmeas inseminadas; GEST (n): número de fêmeas gestantes; TxG (%): taxa de gestação em porcentagem.

$X^2 = (P < 0,05)$; $GL_1 = 3,84$

a = Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si.

Não foram observadas, neste estudo, correlações significativas entre os testes realizados (TTR, teste HO e teste de reação acrossômica) e a fertilidade para as 23 partidas analisadas. Sabe-se que os espermatozóides precisam possuir certos atributos para alcançar o local da fertilização, e é improvável que um processo tão complexo como este poderia ser predeterminado por um único parâmetro de qualidade dos espermatozóides. Os espermatozóides são células multifuncionais e precisam possuir um número grande de atributos para que se tornem potencialmente férteis. Desta forma, um teste que mensure uma única característica dos

espermatozóides provavelmente terá baixo poder para prever se a amostra de sêmen analisada possui baixa ou alta fertilidade. Por isto, para aumentar a precisão dos testes utilizados, análises simultâneas das características múltiplas dos espermatozóides devem ser combinadas para determinar o efeito global dos vários parâmetros individuais dos espermatozóides.

5. CONCLUSÕES

Não existe um só parâmetro que considerado isoladamente permita avaliar a capacidade fertilizante do sêmen, visto que a viabilidade espermática é uma questão multifatorial associada a características de integridade estrutural e funcional de seus componentes.

Os parâmetros espermáticos de morfologia e motilidade progressiva, assim como os testes complementares (teste HO, TTR e RA) são insuficientes por si só para o diagnóstico de fertilidade/infertilidade de partidas de sêmen congelado/descongelado de bovinos.

São necessários novos estudos com objetivos de ponderar os valores alcançados nos diferentes testes complementares e convencionais para alcançar um ranqueamento e/ou valor mínimo para que partidas de sêmen sejam liberadas para uso em programas de IA.

6. BIBLIOGRAFIA

- AHMADI, A. The single sperm curling test, a modified hypo-osmotic swelling test, as a potential technique for the selection of viable sperm for intracytoplasmatic sperm injection. **Fertility and Sterility**, v. 68, n. 2, p. 346- 350, 1997.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J. et al. **Biologia Molecular da célula**. 3ªed. Editora Artes Médicas, 1997, 1294p.
- ALVAREZ, R. H. Aplicações práticas da dosagem de progesterona no leite de vaca pelo teste imuno-enzimático (ELISA). **Zootecnia**, v. 28, p. 1523, 1990.
- AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine of Veterinary Science**. v. 7- 3, p. 145-173, 1987.
- AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v.10, p. 89-98, 1989.
- AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. Spermatozoa function. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L (Eds.), **Equine Reproduction**. Malvern: Lea e Febiger, p. 715-745, 1993.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação do sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termorresistência: efeitos sobre a fertilidade**. São Paulo, 1988. 41p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo.
- BARNABÉ, V.H., BARNABÉ, R. C., VISINTIN, J. S. et al. Estudo comparativo entre as provas rápida e lenta de termo resistência para avaliação de sêmen congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 4, n. 3-4, p. 7-12, 1981a.

- BARNABÉ, R. C., BARNABÉ, V. H., VIANNA, W. T. et al. **Correlações entre motilidade progressiva e retenção do acrossomo em sêmen de bovinos, pós descongelamento e após provas de termo-resistência.** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 18, p. 61-68, 1981b.
- BARTH, A. D. Factors affecting fertility with artificial insemination. **Veterinary Clinics of North American: Food Animal Practice**, v. 9, n. 2, p. 275-290, 1993.
- BARTH, A.D. e OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa.** 1° edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1989. 285p.
- BEDFORD, J. M. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 108-120, 1983.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the Bull spermogram. **Nordisk Veterinær medicin.**, v.53, p 383-391, 1973.
- BREITBART, H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 139-144, 2002.
- BRYAN J. H. D., AKRUK, S. R. A naphthol yellow S and erithrosin B staining procedure for use in studies of the acrosome reaction of rabbit spermatozoa. **Stain Technol.**, v. 52, p. 47-51, 1977.
- BRUYAS, J. F., FIENI, F., TAINTURIER, D. Le Síndrome “repeat-breeding”: analyse bibliographique premiere partie: Étiologie. **Rev. Méd. Vét.**, v. 5, n.144, p. 385-398, 1993.
- BONILLA, B. **Efeito da insulação escrotal sobre as características físicas e morfológicas do sêmen bovino.** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS. Campo Grande, 2003. 40p. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária).
- BORGES, J. C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino.** Universidade Federal de Viçosa – UFV. Viçosa, 2003. 57p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- BREITBART, H. Intracllular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 139-144, 2002.
- BUENO, R. **Criopreservação de sêmen canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento.** Departamento de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Viçosa – UFV. Viçosa – MG. 2000. 91p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal).

- CAIZA DE LA CUEVA, F. I. C., RIGAU, T., PUJOL, R., et al. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 301-315, 1997.
- CASAGRANDE, J. F., PINHEIRO, L. E. L., ALMEIDA, C. A. et al. A influência da motilidade e da velocidade sobre a fertilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 3, n. 2, p. 31-35, 1979a.
- CASAGRANDE, J. F., PINHEIRO, L. E. L., ALMEIDA, C. A., et al. Patologia espermática agrupada segundo BLOM (1972) na avaliação de sêmen para conelação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 3, n. 2, p. 19 – 23, 1979b.
- CASAGRANDE, J. F., ALMEIDA, C. A. Variações no teste de termo-resistência (TTR) com sêmen diluído com citrato-gema e lactose-gema. In: **Simpósio Nacional de Reprodução Animal**, 4, 1981, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1981. p. 14-8.
- CHRISTENSEN, P., WHITFIELD, C. H., PARKINSON, T. J. In vitro induction of acrosome reactions in stallion spermatozoa by heparin and A23187. **Theriogenology**, v. 45, p. 1201-1210, 1994.
- CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as assay to frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v. 42, p. 351-360, 1994.
- CORREA, J. R., RODRIGUES, M. C., PATTERSON, D. J., et al. Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock sperm membrane functional integrity. **Theriogenology**, v. 46, p. 413-420, 1996.
- CORREA, J. R., HEERSCHER JR, G., ZAVOS, P. M. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. **Theriogenology**, v. 47, p.715-721, 1997a.
- CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, p. 721-731, 1997b.
- COX, J. F. Capacitación espermática para fertilización in vitro en rumiantes – aspectos básicos y aplicados in Manipulating the mammalian embryo. **Proceedings** of the third symposium on advanced topics in animal reproduction. FCAVJ-UNESP, p. 27-63, 1990.
- CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p 7-11, 1998.

- CROSS, N. L., MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 635-641, 1989.
- DARNELL, J., LODISH, H., BALTIMORE, D. The plasma membrane. In: **Molecular cell Biology**. 2 ed. New York: Scientific American Books, 1990. cap. 13, p. 491-530.
- DEJARNETTE, J. M. BARNES, D. A., MARSHALL, C. E. Effects of free – and post-thaw thermal insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Theriogenology**, v. 53, p. 1225-1238, 2000.
- DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé. **An. Med. Vet.**, v. 4, p. 215-224, 1967.
- DEN DAAS, N. J. H. G. **Prediction of bovine male fertility**. 1997, 168p. Tese (doutorado) – Institute for Animal Science and Health (ID – DLO), Lelystad. Holanda, 1997.
- DEN DAAS, N. J. H. G. Laboratory assessment of semen characteristics. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 87-94, 1992.
- DIDION, B. A., DOBRINSKY, J. R., GILES, J. R et al. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Research**, v. 22, p. 51-57, 1989.
- DREVIUS L. O. The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of spermatozoa and sperm models. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 28, p. 41-54, 1972.
- DUCCI, M., GAZZANO, A., VILLANI, C., et al. Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. **European Journal of Obstetrics e Gynecology and Reproductive Biology**, v. 102, p. 53-56, 2002.
- ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**. Suppl., n. 47, p. 243-255, 1993.
- ERICSON, S. A., GARNER, D. L., THOMAS, C. A. et al. Interrelationship among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 39, p. 1009–1024, 1993.
- FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and boxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 251-260, 1996.
- FAZELI, A. R., SHANG, B. R., STEENWEG, W. et al. Relationship between sperm-zone pellucida binding assays and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 853-863, 1997.

- FAZELLI, A. R. **Clinical and physiological aspects sperm zona pellucida interaction**. Utrecht: Utrecht University, 1996. 114p. Thesis (Máster of Science in Biotechnology of Reproduction).
- FLESCH, F.M., GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemical Biophys.**, v. 1469, p. 197-235, 2000.
- FONSECA, V. O. **Fisiologia da Reprodução**. In: Curso de pós-graduação “latu senso” Tutoria a distância julgamento de raças zebuínas – FAZU/ABCZ, 1, Uberaba, MG, 1999. Módulo V. Uberaba, 1999, p.128.
- FONSECA, V. O., VALE FILHO, V. R., CHOW, L. A. Efeito da concentração espermática sobre a taxa de gestação de vacas zebus (*Bos taurus indicus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, n. 5, p. 687-697, 1995.
- FONSECA, V. O., VALE FILHO, V. R., MIES FILHO, A. et al., **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992, p. 40.
- GERARD, O., HUMBLLOT, P. Influence of interactions between semen extender and number of spermatozoa on nonreturn rate estimates of fertility for individual Holstein Bulls. **Theriogenology**, v. 36, n. 5, p. 727-737, 1991.
- GILLAN, L., EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**, v. 9, p. 481 – 487, 1997.
- GILBERT, S. F. **Biologia do Desenvolvimento**. 2^a edição Revisada e traduzida. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 578 p. Cap 2 : p 77 e 78.
- GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147, 1996.
- GUERRA, M. O., PETERS, V. M. Aspectos fisiológicos da fertilização em mamíferos. *Biol. Cent. Biol. Reprod.*, UFJF, v. 13, p.7-20, 1994
- HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 6.º edição, Editora Manole LTDA, São Paulo, 1995. 582p.
- HAMMERSTEDT, R. H., GRAHAM, J. K., NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73-88, 1990.
- HANCOCH J. L. The morphology of boar spermatozoa. **J. Roy. Microsc. Sco.**, v. 76, p. 84-97, 1957.

- HARRISON, R. A. P., VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.
- HENRY, M., NEVES, J. P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. CBRA, 2ed., Belo Horizonte, 1998, 49p.
- HOLT, W. V. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. **Reproduction of Fertility and Development**, v. 9, p. 309-319, 1997.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 03-22, 2000.
- HOSSAIN, A. M., RIZK, B., BARIK, S., et al. Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. **Human Reproduction**, v. 13, p. 1578-1583, 1998.
- INAMASSU, A., VECHI, E., LOPES, M. D. Viabilização do teste hip-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 302-304, 1999.
- JANUSKAUSKAS, A., RODRIGUES-MARTINEZ, H. Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. **Acta Veterinária Scandinavica**, v. 36, p. 571-574, 1995.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VER, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M. et al. Development of an assay the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, p.219-228, 1984.
- JEYENDRAN, R. S., ZANEVELD, L. J. D. Controversies in the development and validation of new sperm assays. **Fertility and Sterility**, v. 59, n. 4, p. 726-728, 1993.
- KOEHLER, J. K. Sperm membrane: segregated domains of structure and function. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF BOAR SEMEN, 1, 1985, Uppsala. **Proceedings**. Uppsala, 1985, p. 37-60.
- KROGENAES, A., ANDERSEN BERG, K., HAFNE, A. L., et al. Membrane alterations in Bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. **Acta Veterinária Scandinavica**, v. 35, p. 17-26, 1994.
- LADHA, S., JAMES, P. S. CLARK, D. C. et al., Lateral mobility of plasma membrane lipids in Bull spermatozoa: heterogeneity between surface domains and rigidification following cell death. **Journal of Cell Science**, v. 110, p. 1041-1050, 1997.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Ed Sarvier, p. 838, 2000.

- LENZ, R. W., BALL, G. D., LOHSE, J. K., et al. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidence by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 683-690, 1983.
- LIU, J., TSAI, Y., KATZ, E., et al., High fertilization rate obtained after intracytoplasmic sperm injection with 100% nonmotile spermatozoa selected by using a simple modified hypo-osmotic swelling test. **Fertility and Sterility**, v. 68, n. 2, p. 373-379, 1997.
- MARTINS, L.F. **Avaliação do sêmen e proteínas solúveis do plasma seminal de bodes da raça Pardo Alpina**. Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa – UFV. Viçosa-MG. 2001. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal).
- MAXWELL, W.M.C., WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55-65, 1996.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v. 247, p. 125-142, 1984.
- MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 1. p. 71-78, 1999.
- MELO, M. I. V. **Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino**. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Belo Horizonte, 1999. 67p. Tese (Doutorado em Ciência Animal).
- MENDEZ, J. V., HERRERA, G. G., GARCIA, M. E. G., GONZALEZ, A. T. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0,25ml y 0,5ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. **Vet. Méx.**, v. 25, p. 127-131, 1994.
- MIES FILHO, A. Fisiologia do aparelho genital masculino. In: **Reprodução Animal**, 6 ed. Porto Alegre: Sulina, 1987, v. 1, p. 98-132.
- NEILD D., CHAVES G., FLORES M., et al. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 51, p. 721-727, 1999.
- NEILD, D. M., CHAVES, M. G., FLORES, M., et al. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. **Andrology**, v. 32, p.351-355, 2000.
- NEILD, D. M., GADELLA, B. M., CHAVES, M. G., et al. Membrane changes during different stages of a freeze – thaw protocol for equine semen cryopreservation. **Theriogenology**. v. 59, p. 1693-1705, 2003.
- NIE, G. J., WENZEL, J. G. W. Adaptation of the hypoosmotic test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1005-1018, 2001.

- O'FLAHERTY, C. M., BEORLEGUI, N. B., BECONI, M. T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 52, p. 289-301, 1999.
- OHASHI, O. M. Inseminação Artificial de Bubalinos. In: GONSALVES, P. B., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F., **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Livraria Varela, p. 97-110, 2001.
- OLIVEIRA, E. C. S. **Viabilidade *in vitro* do sêmen de cão submetido a congelamento com diferentes diluidores e crioprotetores**. Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Belo Horizonte MG. 2003. 63p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal).
- PARRISH J.J., SUSKO-PARRISH J.L., GRAHAM J.K. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. **Theriogenology**, v. 51, p.461-472, 1999.
- PARRISH, J. J., SUSKO-PARRISH, J. L., WINER, M. A., et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180, 1988.
- PATRAT, C., SERRES, C., JOVANNET, P. The acrosome reaction in human spermatozoa. **Biology of the Cell**, v. 92, p. 255-266, 2000.
- PICKETT, B. W., MARTIG, R. C., COWAN, W. A. Preservation of bovine spermatozoa at -79 and 196°C. **Journal Dairy Science**, v. 44, p. 2089-2096, 1961.
- PINTO, P. A., SANTOS, A. E., VALE-FILHO, V.R., et al. Tecnologia de sêmen – teste de termo-resistência de sêmen bovino, utilizando-se animais *Bos taurus* e *Bos indicus* . In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE VETERINÁRIA DE LÍNGUA PORTUGUESA, v.1, São Paulo, Anais...p.77, 1978.
- PORTO, P. F. A., PINHEIRO, L. E. L., KUABARA, M. Y. et al. Comparações de índices de gestação obtidos com o uso a campo de sêmen nacional e importado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suppl., p. 105-107, 1993.
- RAO, A. R., BANE, A., GUSTAFSSON, B. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 1980.
- REVELL, S. G., MRODE, R. A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**. v. 36, p.77-86, 1994.
- RODRIGUES-MARTINEZ, H., LARSSON, B., PERTUFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 297-308, 1997.

- ROTA, A., PENZO, N., VICENTI, L. et al. Hipoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p. 1415-1420, 2000.
- ROTA, A., IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J., et al. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog sêmen frozen in a tris extender with or without EQUEX STM paste. **Theriogenology**, v. 51, p. 1045-1058, 1999.
- S.A.E.G. (Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 1998 (Versão 7.0).
- SANTOS, G. C. J. **Viabilidade de sêmen eqüino congelado em meios diluidores de diferentes composições**. Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Belo Horizonte-MG. 2003. 58p. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal).
- SAS, SAS START. User's Guide (5º edição) SAS Inst. Inc., Cary, NC, 1990.
- SCHENK R. P., AMANN, R. P., ALLEN, C. H. Effects of extender and insemination dose on post-thaw quality and fertility of bovine sperm. **Journal Dairy Science**, v. 70, p. 1458-1464, 1987.
- SENGER, P. L. The estrus detection problem: New concepts, Technologies, and possibilities. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2745-2753, 1994.
- SILVA, M.R. **Taxa de gestação e avaliação de sêmen congelado/descongelado de touros da raça Nelore utilizando testes convencionais e de adesão in vitro de espermatozoides à zona pelúcida de ovócitos bovinos imaturos**. Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa – MG. Viçosa-MG. 2000. 75p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal).
- SILVA, A. E. D. F. **Reação Acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 1998, 38p.
- SILVA, L. D. M., VERTSTEGEN, J. P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v. 44, p. 571-579, 1995.
- SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Front. Biosc.**, v.1, p. 78-86, 1996.
- SNOECK, P. P. N. **Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade**. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Belo Horizonte, 2003. 116p. Tese (Doutorado em Ciência Animal).
- SODERQUIST, L., JANSSON, L., LARSSON, K. et al. Sperm morphology and fertility in AI bulls. **Journal Veterinary Medicine Animal**, v. 38, p. 534-543, 1991.

- SODERQUIST, L., MADRID-BURY, N., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. **Theriogenology**, v. 48, p.1115-1125, 1997.
- STEINHOLT, H. C., CHANDLER, J. E., TIRADO, V. Evaluating acrosome reaction steps with brightfield and defferential interference contrast microscopy techniques. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3822-3826, 1991.
- THÉRIEN, I., BLEAU, G., MANJUNATH, P. Phosphatidylcoline-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 1372-1379, 1995.
- VALE FILHO, V. R. Padrões de sêmen bovino para o Brasil. Análise e sugestões. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução**, 8, 1989, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1989, p. 94-118. (Palestra).
- VALE FILHO, V. R. Aspectos da eficiência reprodutiva do touro, usado nas condições de Brasil Central. **Informativo Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 8, p. 46-63, 1982.
- VALLE, E. C., ENCARNAÇÃO, P. A., BARROS, C. M., et al. Manifestação de cio natural em vacas Nelore. IN: **Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias**, Campo Gande. Anais... Campo Grande, p. 408, 1996.
- VAZQUEZ, J. M., MARTINEZ, E. A., MARTINEZ, P. et al. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. **Theriogenology**, v. 47, p. 913-922, 1997.
- VOGLER, C. J., SAACKE, R. G., BAME, J. H. et al. Effect of scrotal insulation on viability of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3827-3835, 1991.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E., NEILL, J. **The Physiology of Reproduction**. New York: Ed. Raven Press, 1994, p. 135-185.
- YANAGIMACHI, R., Sperm capacitation and gamete interaction. **Journal Reproduction and Fertility**, Suppl. V. 38, p. 27-33, 1989.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**. v. 60, p. 481-492, 2000.
- WHITFIELD, C. H., PARKINSON, T. J. Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin. **Theriogenology**, v. 38, p.11-20, 1992.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina.** Campus Botucatu – Universidade Estadual Paulista – UNESP. Botucatu – SP. 1998. 121p. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária).

7. ANEXO

Tabela 1A. Preparo da solução de frutose a 100 mOsm/Kg, empregado no teste hiposmótico

| Reagente | Quantidade |
|-------------------------|------------|
| Frutose (g) | 0,9 |
| Citrato Trisódico (g) | 0,49 |
| Água destilada (q.s.p.) | 100 mL |

Fonte: Revell e Mrode, (1994)

Tabela 2 A: Taxa de gestação obtida por partida de sêmen selecionadas, quanto ao status reprodutivo (plurípara, primíparas e nulíparas) e de retiros da fazenda.

| PARTIDA | ESP. | FÊMEAS | POSITIVAS | NEGATIVAS | TXG (%) |
|---------|-------|--------|-----------|-----------|---------|
| 1 | TOTAL | 27 | 13 | 14 (3)* | 48,14 |
| | PLU | 24 | 10 | 14 (3) | 41,66 |
| | N | 3 | 3 | 0 | 100,00 |
| | R4 | 24 | 10 | 14(3) | 41,66 |
| | R5 | 3 | 3 | 0 | 100,00 |
| 2 | TOTAL | 38 | 32 | 6(1) | 84,21 |
| | PLU | 16 | 13 | 3 | 81,25 |
| | N | 22 | 19 | 3 (1) | 86,36 |
| | R1 | 3 | 3 | 0 | 100,00 |
| | R4 | 13 | 10 | 3 | 76,92 |
| | R5 | 22 | 19 | 3 (1) | 86,36 |
| 3 | TOTAL | 35 | 27 | 8 | 77,14 |
| | PLU | 12 | 8 | 4 | 66,66 |
| | N | 23 | 19 | 4 | 82,60 |
| | R1 | 7 | 6 | 1 | 85,71 |
| | R4 | 5 | 2 | 3 | 40,00 |
| | R5 | 23 | 19 | 4 | 82,60 |

| | | | | | |
|----|-------|-----|----|-------|--------|
| 4 | TOTAL | 34 | 22 | 12 | 64,70 |
| | PLU | 23 | 17 | 8 | 68,00 |
| | P | 6 | 4 | 2 | 66,66 |
| | N | 3 | 1 | 2 | 33,33 |
| | R1 | 2 | 2 | 0 | 100,00 |
| | R2 | 4 | 2 | 2 | 50,00 |
| | R3 | 9 | 5 | 4 | 55,55 |
| | R4 | 16 | 12 | 4 | 75,00 |
| | R5 | 3 | 1 | 2 | 33,33 |
| 5 | TOTAL | 33 | 24 | 9(1) | 72,72 |
| | P | 20 | 15 | 5(1) | 75,00 |
| | N | 13 | 9 | 4 | 69,23 |
| | R1 | 5 | 2 | 3 | 40,00 |
| | R4 | 15 | 13 | 2(1) | 86,66 |
| | R5 | 13 | 9 | 4 | 69,23 |
| 6 | TOTAL | 129 | 70 | 59(3) | 54,26 |
| | PLU | 71 | 42 | 29(2) | 59,15 |
| | P | 15 | 10 | 5 | 66,66 |
| | N | 43 | 18 | 25(1) | 41,86 |
| | R1 | 3 | 3 | 0 | 100,00 |
| | R3 | 6 | 3 | 3 | 50,00 |
| | R4 | 67 | 38 | 29(2) | 56,71 |
| | R5 | 53 | 26 | 27(1) | 49,05 |
| 7 | TOTAL | 42 | 23 | 19(2) | 54,76 |
| | PLU | 26 | 15 | 11 | 57,69 |
| | P | 3 | 1 | 2(1) | 33,33 |
| | N | 13 | 7 | 6(1) | 53,84 |
| | R1 | 4 | 4 | 0 | 100,00 |
| | R4 | 22 | 11 | 11 | 50,00 |
| | R5 | 16 | 8 | 8(2) | 50,00 |
| 8 | TOTAL | 38 | 27 | 11(1) | 71,05 |
| | PLU | 32 | 24 | 8(1) | 75,00 |
| | N | 6 | 3 | 3 | 50,00 |
| | R1 | 3 | 3 | 0 | 100,00 |
| | R4 | 29 | 21 | 8(1) | 72,41 |
| | R5 | 6 | 3 | 3 | 50,00 |
| 9 | TOTAL | 35 | 29 | 14 | 60,00 |
| | PLU | 24 | 14 | 10 | 58,33 |
| | N | 11 | 7 | 4 | 63,63 |
| | R1 | 3 | 2 | 1 | 66,66 |
| | R4 | 21 | 12 | 9 | 57,14 |
| | R5 | 11 | 7 | 4 | 63,63 |
| 10 | TOTAL | 33 | 21 | 12 | 63,63 |
| | PLU | 22 | 13 | 9 | 59,09 |
| | P | 2 | 2 | 0 | 59,09 |
| | N | 9 | 6 | 3 | 66,66 |
| | R1 | 5 | 2 | 3 | 40,00 |
| | R3 | 2 | 2 | 0 | 100,00 |
| | R4 | 17 | 11 | 6 | 64,70 |

| | | | | | |
|----|-------|----|----|-------|--------|
| | R5 | 9 | 6 | 3 | 66,66 |
| 11 | TOTAL | 48 | 30 | 18(3) | 62,5 |
| | PLU | 19 | 8 | 11(3) | 42,10 |
| | P | 1 | 0 | 1 | 0,00 |
| | N | 28 | 22 | 6 | 78,57 |
| | R1 | 6 | 2 | 4(2) | 33,33 |
| | R3 | 1 | 0 | 1 | 0,00 |
| | R4 | 13 | 6 | 7(1) | 0,00 |
| | R5 | 28 | 22 | 6 | 78,57 |
| 12 | TOTAL | 59 | 34 | 25(4) | 57,62 |
| | PLU | 20 | 12 | 8(1) | 60,00 |
| | P | 22 | 14 | 8(1) | 63,63 |
| | N | 17 | 8 | 9(2) | 100,00 |
| | R1 | 4 | 4 | 0 | 100,00 |
| | R2 | 1 | 0 | 1 | 0,00 |
| | R3 | 23 | 14 | 9 | 60,86 |
| | R4 | 14 | 8 | 6(1) | 57,14 |
| | R5 | 17 | 8 | 9(2) | 47,05 |
| 13 | TOTAL | 36 | 27 | 9(1) | 75 |
| | PLU | 18 | 15 | 3 | 83,33 |
| | N | 18 | 12 | 6(1) | 66,66 |
| | R4 | 18 | 15 | 3 | 83,33 |
| | R5 | 18 | 12 | 6(1) | 66,66 |
| 14 | TOTAL | 57 | 37 | 20(3) | 64,91 |
| | PLU | 32 | 19 | 13(3) | 59,37 |
| | N | 25 | 18 | 7 | 72,00 |
| | R4 | 32 | 19 | 13(3) | 59,37 |
| | R5 | 25 | 18 | 7 | 72,00 |
| 15 | TOTAL | 74 | 57 | 17(5) | 77,02 |
| | PLU | 37 | 30 | 7(4) | 81,08 |
| | N | 37 | 27 | 10(1) | 72,97 |
| | R1 | 12 | 11 | 1 | 91,66 |
| | R4 | 25 | 19 | 6(3) | 76,00 |
| | R5 | 37 | 27 | 10(1) | 72,97 |
| 16 | TOTAL | 57 | 47 | 10(2) | 82,45 |
| | PLU | 36 | 31 | 5 | 86,1 |
| | N | 21 | 16 | 5(2) | 76,19 |
| | R1 | 13 | 12 | 1 | 92,3 |
| | R4 | 23 | 19 | 4 | 82,6 |
| | R5 | 21 | 16 | 5(2) | 76,19 |
| 17 | TOTAL | 39 | 27 | 12(3) | 69,23 |
| | PLU | 1 | 1 | 0 | 100,00 |
| | N | 1 | 1 | 0 | 100,00 |
| | P | 37 | 25 | 12(3) | 68,42 |
| | R3 | 38 | 26 | 12(3) | 68,42 |
| | R5 | 1 | 1 | 0 | 100,00 |
| 18 | TOTAL | 85 | 55 | 30(5) | 64,70 |
| | PLU | 57 | 38 | 19(5) | 66,66 |
| | P | 11 | 9 | 2 | 81,81 |
| | N | 17 | 8 | 9 | 47,05 |

| | | | | | |
|----|-------|----|----|--------|--------|
| | R1 | 1 | 1 | 0 | 100,00 |
| | R3 | 4 | 2 | 2 | 50,00 |
| | R4 | 56 | 37 | 19(5) | 66,07 |
| | R5 | 24 | 15 | 9 | 62,5 |
| 19 | TOTAL | 58 | 42 | 16(1) | 72,41 |
| | PLU | 38 | 28 | 10 | 73,68 |
| | P | 8 | 7 | 1(1) | 87,5 |
| | N | 12 | 7 | 5 | 58,33 |
| | R4 | 38 | 28 | 10 | 73,68 |
| | R5 | 20 | 14 | 6 | 70,00 |
| 20 | TOTAL | 68 | 28 | 40(20) | 41,17 |
| | PLU | 68 | 28 | 40(20) | 41,17 |
| | R3 | 68 | 28 | 40(20) | 41,17 |
| 21 | TOTAL | 29 | 15 | 14(9) | 51,72 |
| | PLU | 29 | 15 | 14(9) | 51,72 |
| | R3 | 25 | 13 | 12(9) | 52,00 |
| | R4 | 4 | 2 | 2 | 50,00 |
| 22 | TOTAL | 38 | 11 | 27(14) | 28,94 |
| | PLU | 38 | 11 | 27(14) | 28,94 |
| | R3 | 38 | 11 | 27(14) | 28,94 |
| 23 | TOTAL | 24 | 17 | 7 | 70,83 |
| | PLU | 17 | 12 | 5 | 70,58 |
| | N | 7 | 5 | 2 | 71,42 |
| | R1 | 1 | 0 | 1 | 0,00 |
| | R4 | 16 | 12 | 4 | 75,00 |
| | R5 | 7 | 5 | 2 | 71,42 |

*: os números entre () definem a quantidade de fêmeas que não apresentaram estro após a inseminação e não diagnosticadas como gestantes no final da estação.

ESP: Especificação de como foram utilizadas as partidas; FÊMEAS: número de fêmeas inseminadas; POSITIVAS: % de fêmeas gestantes; NEGATIVAS: % de fêmeas não gestantes; TxG: % da taxa de gestação; PLU: pluríparas; P: primíparas; N: nulíparas; R1, retiro 1; R2: retiro 2; R3: retiro 3; R4: retiro 4; R5: retiro 5.