

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Programa de Pós-Graduação Veterinária**

**TESTES FUNCIONAIS DE MEMBRANA E ÍNDICE DE  
PRENHEZ UTILIZANDO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE  
TOURINHOS TABAPUÃ AOS DOIS ANOS DE IDADE, CRIADOS  
A PASTO E PREVIAMENTE SELECIONADOS PELA CAP**

**LUCAS LUZ EMERICK**

**Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2007**

**LUCAS LUZ EMERICK**

**TESTES FUNCIONAIS DE MEMBRANA E ÍNDICE DE  
PRENHEZ UTILIZANDO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE  
TOURINHOS TABAPUÃ AOS DOIS ANOS DE IDADE, CRIADOS  
A PASTO E PREVIAMENTE SELECIONADOS PELA CAP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Reprodução Animal  
Orientador: Vicente Ribeiro do Vale Filho

**Belo Horizonte**

**UFMG – Escola de Veterinária**

**2007**

E53t Emerick, Lucas Luz, 1979-  
Testes funcionais de membrana e índice de prenhez utilizando sêmen criopreservado de tourinhos Tabapuã aos dois anos de idade, criados a pasto e previamente selecionados pela CAP / Lucas Luz Emerick. – 2007.  
43 p. : il.

Orientador: Vicente Ribeiro do Vale Filho  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Tabapuã (Zebu) – Reprodução – Teses. 2. Sêmen – Criopreservação – Teses. 3. Sêmen – Análise – Teses. 4. Reprodução animal – Teses. I. Vale Filho, Vicente Ribeiro do. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.291





## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho às pessoas que convivem comigo e que de alguma forma torcem por mim, pois são esses, que me inspiram vencer barreiras em busca da conquista.

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.  
**Isaac Newton**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela existência e saúde para que possa buscar meus ideais.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus familiares pelo apoio incondicional, estrutura familiar e por ceder parte dos animais para execução desse trabalho.

Ao Professor Vicente Ribeiro do Vale Filho, pela orientação, oportunidade, amizade, paciência, pelos momentos agradáveis, pelos conselhos, sugestões, confiança, meu eterno agradecimento.

Ao professor Venício José de Andrade, pelos “puxões de orelha”, pela paciência, serenidade, confiança, ensinamentos e amizade.

Ao professor Martinho de Almeida e Silva, pela simpatia que sempre me recebeu e pelas valiosas e fundamentais sugestões ao trabalho.

Ao Luis Sérgio de Almeida Camargo, pela simpatia e disponibilidade que me recebeu na EMBRAPA em Juiz de Fora, pelos ensinamentos na execução do estudo.

Ao professor Luiz Altamiro Garcia Nogueira, pelo conforto e paciência no momento da defesa e por ter aceito a participar da banca.

Aos demais professores do setor de reprodução animal da EV-UFMG pelas aulas, convívio e respeito.

A Marina I.F.C. pelo apoio e colaboração em momentos difíceis.

Aos amigos Juliano, Jorge, Paulo, Ticiano e outros colegas da pós-graduação pela colaboração, amizade, sugestões e convívio em momentos difíceis e prazerosos.

Aos amigos Dário Dias e a Nilda pela amizade, paciência, confiança e dedicação prestadas.

Aos companheiros de república Élder e Gilberto e convivência.

A Dr<sup>a</sup> Marisa Vianna Rodrigues por ceder parte dos animais e por sempre acreditar nesse trabalho.

Muito Obrigado

---

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE TABELAS</b>	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	8
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	10
<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b>	12
1 <b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2 <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 Membranas celulares .....	14
2.2 Fatores que desencadeiam mudanças nas membranas espermáticas .....	15
2.2.1 Criopreservação .....	15
2.2.2 Capacitação .....	17
2.2.3 A reação acrossômica e fecundação .....	20
2.3 Métodos de avaliação de sêmen .....	21
2.4 Avaliação andrológica .....	22
2.5 Teste hiposmótico (Host) .....	23
2.6 Teste de termorresistência (TTR) .....	24
2.7 Reação acrossômica induzida (RAI) .....	24
3 <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
4 <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
5 <b>CONCLUSÕES</b> .....	38
6 <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	38

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1	Perfil zootécnico, andrológico e congelabilidade de sêmen de doze tourinhos tabapuã com dois anos de idade, criados a pasto, e selecionados pelo CAP .....	28
Tabela 2	Efeito da criopreservação sobre a motilidade e defeitos espermáticos em tourinhos Tabapuã com dois anos de idade criados a pasto.....	29
Tabela 3	Teste de termorresistência lento (TTR lento/ 38°C por 4hs) efetuado no sêmen criopreservado de doze tourinhos Tabapuã selecionados pelo CAP aos dois anos de idade.....	30
Tabela 4	Comparação de defeitos espermáticos (%) observados em função da criopreservação do sêmen, pós TTR rápido (30'/ 45°C) e pós TTR lento (4 hs/38°C) em tourinhos da raça Tabapuã, de dois anos de idade criados a pasto..	30
Tabela 5	Diferenças entre grupos com motilidade espermática inferior e superior a 40 % em relação a testes funcionais e de índice de prenhez a campo, em sêmen criopreservado de tourinhos tabapuã com dois anos de idade, criados extensivamente.....	31
Tabela 6	Efeitos da heparina e LPC na reação acrossômica induzida e na taxa de espermatozoides vivos, em sêmen criopreservado e incubado por 4: 15 horas, de tourinhos Tabapuã com dois anos de idade, criados a pasto.....	32

Tabela 7	Diferenças entre testes funcionais em grupos de sêmen com índices de prenhez (IP*), na primeira IA, acima ou abaixo que 50 % em tourinhos tabapuã com dois anos de idade, criados a pasto.....	33
Tabela 8	Correlações de Pearson entre os principais parâmetros espermáticos avaliados..	36
Tabela 9	Resultado das análises de Regressão Múltipla utilizando os testes de termorresistência rápida, hiposmótico, reação acrossômica induzida, motilidade pós-descongelamento, defeitos maiores e totais pré congelamento, avaliados separadamente, ou em conjunto, para se prever a taxa de prenhez a campo.....	38

---

**LISTA DE FIGURA**

---

Figura 1	Comparação entre os testes que avaliam a integridade das membranas espermáticas em sêmen criopreservado de tourinhos Tabapuã aos dois anos de idade, selecionados pelo CAP.....	34
----------	---	----

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

IA – Inseminação artificial;  
TE – Transferência de embrião;  
FIV – Fertilização “in vitro”;  
MN – Monta natural;  
EM – Estação de monta;  
CAP – Classificação Andrológica por Pontos;  
IP – Índice de prenhez na primeira IA, confirmada pela palpação retal aos 60 dias;  
ATP – Adenosina tri – fosfato;  
AC – Adenilil ciclase;  
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico;  
PKA – Proteína quinase A;  
GAGs – Glicosaminoglicanos;  
PAH – Proteína com afinidade a heparina;  
RA – Reação acrossômica;  
PIP2 – Fosfatidilinositol bifosfato;  
RAI – Reação acrossômica induzida;  
BSE – Breeding Soundness Evaluation;  
CE – Circunferência escrotal;  
Thos – Teste hiposmótico;  
TTRI – Teste de termorresistência lento;  
TTRr – Teste de termorresistência rápido;  
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;  
LPC – Lisofosfatidilcolina;  
Conc – Concentração espermática pré congelamento do sêmen;  
Tur – Turbilhonamento;  
Mot Pré – Motilidade retilínea progressiva espermática pré-congelamento em porcentagem;  
Vig – vigor espermático pré – pós congelamento;  
DM – Defeitos espermáticos maiores em porcentagem;  
Dm – Defeitos espermáticos menores em porcentagem;  
DT – Defeitos espermáticos totais em porcentagem;  
Mot Pós – Motilidade retilínea progressiva espermática pós congelamento;  
Pré cong – Parâmetros espermáticos aferidos antes do congelamento do sêmen;  
Pós cong – Parâmetros espermáticos aferidos depois do descongelamento do sêmen;  
Dacros – Defeito espermático de acrossoma;  
Cdob – Defeito espermático de cauda dobrada;  
Mot – Motilidade retilínea progressiva;  
RAI 1 – Porcentagem de espermatozóides vivos com reação acrossômica após incubação com Talp hepes + sêmen durante 4:15 horas;  
RAI 2 – Porcentagem de espermatozóides vivos com reação acrossômica após incubação com Talp hepes + sêmen + heparina durante 4:15 horas;  
RAI 3 – Porcentagem de espermatozóides vivos com reação acrossômica após incubação com Talp hepes + sêmen + heparina + lisofosfatidilcolina (LPC) durante 4:15 horas;  
% vivos – Porcentagem de espermatozóides vivos pelo azul de tripan;  
Txviv 0 – Taxa de espermatozóides vivos logo após o descongelamento do sêmen pela técnica do azul de tripan;  
TxvivRAI 3 – Taxa de espermatozóides vivos após o tratamento com a heparina e o LPC pela técnica do azul de tripan;

---

### LISTA DE ABREVIATURAS

---

DMpré – Defeitos espermáticos maiores antes do congelamento do sêmen;  
Dmpré – Defeitos espermáticos menores antes do congelamento do sêmen;  
DTpré – Defeitos espermáticos totais antes do congelamento do sêmen;  
DMpós – Defeitos espermáticos maiores após o congelamento do sêmen;  
Dmpós – Defeitos espermáticos menores após o congelamento do sêmen;  
DTpós – Defeitos espermáticos totais após o congelamento do sêmen;  
DMr – Defeitos espermáticos maiores após incubação no TTR rápido;  
Dmr - Defeitos espermáticos menores após incubação no TTR rápido;  
DTr – Defeitos espermáticos totais após incubação no TTR rápido;  
DMI – Defeitos espermáticos maiores após incubação no TTR lento;  
Dml - Defeitos espermáticos menores após incubação no TTR lento;  
DTI – Defeitos espermáticos totais após incubação no TTR lento;

---

**Testes funcionais de membrana e índice de prenhez utilizando sêmen criopreservado de tourinhos Tabapuã aos dois anos de idade, criados a pasto e previamente selecionados pela CAP**

**RESUMO**

Doze tourinhos da raça Tabapuã que apresentaram sêmen pré-pós criopreservação dentro dos padrões estabelecidos pelo CBRA (1998), foram submetidos aos testes funcionais de termorresistência rápida e lenta (TTRr e TTRl), hiposmótico (Thos), reação acrossômica induzida (RAI), taxa de espermatozoides vivos pelo azul de tripan (Txviv 0) e índice de prenhez na primeira inseminação artificial (IP). Foram comparados os resultados testes funcionais espermáticos, com relação ao IP e com a motilidade espermática pós-congelamento (Mot Pós). De acordo com a média do IP e da Mot Pós, os tourinhos foram separados em dois grupos. Foram também estimadas as correlações entre os diferentes parâmetros espermáticos avaliados. Registraram-se diferenças ( $p < 0,05$ ) tanto para o Thos, como para os TTRr e TTRl em relação à Mot Pós. Não se observaram diferenças ( $p > 0,05$ ) entre nenhum parâmetro estudado quando agrupados em lotes com IP. O modelo de regressão múltipla, que incluiu todas as variáveis estudadas em sêmen pós-congelamento, mesmo com  $R^2 = 0,83$ , não explicou ( $p > 0,05$ ), as variações no IP. Concluiu-se que utilizando as normas sugeridas pelo CBRA (1998), são adequados para garantia de adequado IP, não se justificando a utilização adicional de qualquer dos testes funcionais estudados, para o uso na IA. Nenhum dos testes empregados, separadamente ou em conjunto, foi eficaz em prever o IP.

**Palavras chave:** sêmen, criopreservação, teste funcional, índice de prenhez, primeira inseminação.

**Functional test of membrane and pregnancy rates utilizing cryopreserved semen of Tabapuã young bulls of the two years old, raised in past condition and selected previously to BSE-Z**

**ABSTRACT**

According to Brazilian College of Animal Reproduction (BCAR) criteria for post freezing semen classification, 12 young bulls were further selected to evaluate semen quality based on fast (TTRf) and slow (TTRs) termoresistence tests, hyposmotic test (HOST), induced acrossomic reaction by heparin (IAR), percentage of live sperm stained by trypan blue, and pregnant rate of first artificially inseminated females with semen from those bulls. Functional sperm test results were compared and their association with pregnancy rate and post-freezing motility were also evaluated. Bulls were further grouped according to post-freezing sperm motility (PFSM) and pregnancy rate (PR) to compare functional test results. Estimates of phenotypic correlation between pairs of spermatic parameters were also obtained. Differences ( $P < .05$ ) between PFSM  $> 40\%$  and PFSM  $< 40\%$  were observed for TTRf, TTRs and HOST. No differences ( $P > .05$ ) between functional test results were registered when grouped by PR  $> 50\%$  and PR  $< 50\%$ . Multiple regression model having functional, physical and morphological post-freezing semen test results as independent variables did not accounted ( $P > .05$ ) for pregnancy rate variation even with a  $R^2 = 0,83$ . No additional functional tests to BCAR standard criteria are necessities to ensure high female pregnancy rate.

**Key words:** semen, criopreservation, functional test, pregnancy rate, first artificial insemination first.

## 1 - INTRODUÇÃO

Na evolução das raças bovinas de corte no Brasil, quer de origem européia ou indiana, incluindo também, mais recentemente, os compostos, zebu x zebu ou zebu x europeu, ressalta-se a preocupação atual dos criadores e técnicos na busca de animais equilibrados, em sintonia com os sistemas de produção, em busca de adaptabilidade, e, especialmente, de eficiência econômica. Assim sendo, características como fertilidade, taxas de crescimento e conformação frigorífica, além daquelas relacionadas à qualidade final de carcaça dos produtos estão sendo muito valorizadas, devido às demandas do mercado externo (Da Silva, 2006). A raça Tabapuã, dentro deste contexto, vêm se destacando por oferecer várias destas características, sendo rústica, de baixo custo de produção, e em decorrência, com grande demanda de sêmen para uso no processo de inseminação artificial (IA), para ser criada pura, ou na formação de cruzamentos.

A pecuária bovina no Brasil é uma atividade importante na economia, visto que o país possui o maior rebanho comercial do mundo, destacando-se pelo elevado potencial efetivo e ainda grande perspectiva de crescimento (Dias, 2004; Celeghini, 2005). Neste contexto, as raças zebuínas e seus cruzamentos apresentam grande importância na formação dos rebanhos nacionais e representam cerca de 80% do efetivo bovino brasileiro. O aumento da produtividade da pecuária nacional pode ser obtido com o emprego de biotecnologias que otimizem o sistema de produção, buscando maior produção por hectare e assim, diminuindo custos, maximizando o uso da genética superior (Celeghini, 2005). Em vista disto, ocorreram grandes avanços nas biotecnologias da reprodução animal (De Soto, 2005). Nesse contexto a criopreservação de gametas tornou-se um procedimento essencial para a aplicação destas tecnologias, pois elimina as

limitações de tempo e distância (Parks, 1997).

A demanda de sêmen criopreservado vem aumentando no Brasil na última década devido ao uso cada vez mais intenso do melhoramento genético nos rebanhos através da IA, e do maior emprego de biotécnicas como a transferência de embriões (TE) e a fertilização “in vitro” (F.I.V.) (De Soto, 2005). A IA é uma das técnicas mais simples e de baixo custo empregada na reprodução animal e a que apresenta melhor resultado nos programas de melhoramento genético do rebanho, com a utilização de sêmen de reprodutores de comprovado valor genético. Apesar de sua aparente simplicidade, a IA requer um criterioso e rígido controle nas suas diferentes etapas, que vão da seleção dos reprodutores doadores de sêmen, passando pelos processos tecnológicos de envasamento e criopreservação do material fecundante e pelo controle sanitário e ginecológico das matrizes, até ao treinamento do inseminador (Vale Filho et al., 1994; Ohashi, 2002;).

Tanto no uso da monta natural (MN) quanto no da IA (com sêmen congelado), através de estação de monta (EM) bem definida (em gado de corte), conseguem-se elevados índices de fecundação (80-90%), pela eliminação de touros portadores de distúrbios andrológicos e da seleção pela CAP (Classificação Andrológica por Pontos), dando-se preferência àqueles animais andrológicamente mais competentes, quando se planeja, obter-se taxa de nascimento homogênea, para uma produção mais equilibrada dos rebanhos (Vale Filho et al., 1988; 1989).

Índices de fecundação obtidos pelo sêmen congelado, tanto no uso da IA quanto na FIV, têm apresentado grande variabilidade, mesmo com amostras de alta recuperação pós congelabilidade. Apesar dos grandes avanços ocorridos na obtenção de crioprotetores mais eficientes

(principalmente no caso dos bovinos), ainda são necessários estudos que elucidem melhor a funcionabilidade de membranas espermáticas (Rodríguez-Martínez, 2003).

Dessa forma, novos testes em sêmen bovino criopreservado têm sido utilizados para avaliarem membranas plasmáticas, mitocôndrial e acrossomal, além de prova de resistência metabólica e estrutura de cromatina, na tentativa de prever com maior acurácia a qualidade do sêmen, já que os testes padrões utilizados, como motilidade, número e morfologia não são suficientes para o diagnóstico da real capacidade fecundante dos espermatozoides (Melo, 1999; Zhang et al., 1999; Rodríguez-Martínez, 2003).

Dessa forma os objetivos desse estudo foram:

- (1) Avaliar a qualidade de membranas espermáticas pós-criopreservação, em quatro diferentes testes, entre amostras de sêmen de tourinhos Tabapuã, aos dois anos, selecionados pelo CAP;
- (2) Comparar os testes realizados (andrológicos e funcionais pós-criopreservação do sêmen) com o IP e entre si;
- (3) Verificar se há necessidade de se adicionar algum dos testes complementares estudados em amostras de sêmen bovino criopreservado para melhor predição do IP;
- (4) Utilizar os testes andrológicos e funcionais realizados em conjunto ou em separadamente, na tentativa de prever o IP;

## **2 - REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 - Membranas Celulares**

As membranas são essenciais para a vida celular, pois definem seus limites e equilibram as diferenças entre o citoplasma e o meio extracelular (Alberts et al., 1994).

Em todas as células estas estruturas possuem proteínas que agem como sensores para sinais externos, avisando quando há necessidade de se promoverem mudanças em relação às modificações do meio. Estas proteínas sensoriais (ou receptoras) transferem informações antes que íons, ou moléculas, atravessem a membrana (Alberts et al., 1994).

Apesar de diferenças funcionais, toda membrana biológica tem estrutura geral comum, sendo constituída de uma camada fina de lipídios e proteínas ligadas entre si, por interações não covalentes. As membranas celulares são estruturas fluidas, dinâmicas e a maioria das moléculas é capaz de mover em torno de seu próprio eixo. As camadas de lipídios são arrançadas como dupla camada de aproximadamente 5 nm (nanômetros) de espessura, que fornece estrutura básica e servem como barreira relativamente impermeável à passagem da maioria das moléculas solúveis em água. Esses lipídios são organizados por uma cadeia constituída de 3 ácidos graxos ligados a um glicerol. A parte polar (hidrofílica) da cadeia está voltada para o exterior e interior da célula, enquanto a apolar (hidrofóbica), liga-se as bordas polares das cadeias de hidrocarbonos (Alberts et al., 1994).

As moléculas de proteínas solubilizam a bicamada lipídica mediando a maioria das funções da membrana (transporte específico de moléculas). Algumas servem como sítios estruturais que conectam a membrana ao citoesqueleto, e/ou a matriz extracelular, ou à célula adjacente, enquanto outras, servem de receptores para detectar e traduzir sinais químicos do ambiente celular (Alberts et al., 1994).

As membranas celulares são estruturas assimétricas. A composição de lipídios e proteínas das faces interna e externa diferem, e se relacionam de acordo com a maneira que exercem suas funções. A bicamada lipídica é composta de fosfolipídios, colesterol e glicolipídeos, e diferem de acordo com as espécies. Os principais fosfolipídios são a fosfatidilcolina, esfingomiéline, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, que juntos representam mais de 50% dos lipídios de membrana, e suas proporções são espécies dependentes (Alberts et al., 1994). Dentre esses, o fosfatidilcolina e esfingomiéline em condições normais, estão mais concentrados no lado externo da bicamada lipídica, enquanto a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina estão no lado interno da mesma (Thomas et al., 2006).

Altas concentrações de colesterol e de ácidos graxos saturados (cadeias de hidrocarbonos restritas em ligações duplas) nas membranas tendem a fazer uma bicamada menos fluida, prevenindo a ligação e cristalização das cadeias de hidrocarbonos. A bicamada faz mudanças de um estado líquido para o estado cristalino rígido (gel) como uma característica do ponto de congelamento. Esta mudança no estado é chamada de fase de transição e a temperatura que isto ocorre é mais baixa quanto mais curta ou dupla ligações a membrana tiver em sua composição. Uma cadeia curta reduz a tendência das caudas de hidrocarbonos de se interagirem e a ligação dupla (chamada de cis) produz uma dobra na cadeia de hidrocarbonos fazendo com que seja mais difícil de agregá-los, mantendo esta mais fluida a altas temperaturas (Alberts et al., 1994).

No exterior da célula as proteínas integrais (as que atravessam a membrana), e as proteínas periféricas, ancoram oligossacarídeos (glicoproteínas) que formam o glicocálix, que tem como função

proteger a membrana e interagir com substâncias vizinhas que entram em contato com esta (Alberts et al., 1994).

## **2.2 - Fatores que desencadeiam mudanças nas membranas espermáticas**

A célula espermática possui vários compartimentos celulares que são delimitados por membranas. O espermatozóide do testículo até as ampolas da tuba uterina, passa por vários meios ambientes, que desencadeiam mudanças em sua estrutura bioquímica, que protegem a célula, conduzindo-a em favor da fertilização. Dessa forma é imprescindível que essa estrutura esteja em perfeitas condições físico-morfológicas para que ocorra interação, ligação e fusão entre esse e o oócito (Gadella et al., 2001). É necessário entender as transformações ocorridas no gameta masculino para que se entendam as falhas no processo de fecundação.

### **2.2.1 - Criopreservação**

Estima-se que durante o processo de criopreservação a viabilidade espermática, avaliada pela morfologia do acrossoma, motilidade, vigor e integridade de suas membranas sejam reduzidas em 50%. Durante esse processo, esta célula está sujeita aos estresses químicos, osmóticos, térmicos e mecânicos, sendo que estes são originados, principalmente, nas fases de resfriamento e descongelamento do sêmen (Rasul et al., 2001).

Alguns trabalhos reportam que transformações ocorridas nas membranas espermáticas durante a criopreservação, sejam semelhantes àsquelas do processo de capacitação. O “status” de capacitação dado ao espermatozóide criopreservado é de interesse da pesquisa, visto que a capacitação reduz a longevidade do mesmo, principalmente em espécies em que o período de estro é longo, onde requer mais cuidado no tempo de inseminação/ ovulação.

Mudanças deletérias na estrutura e integridades das membranas têm sido associadas à reduzida fertilidade de sêmen congelado-descongelado. A composição de fosfolípides é assimétrica, com fosfatidilcolina e esfingomiéline concentrado do lado externo da bicamada lipídica, enquanto fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina são concentrados do lado interno da mesma. Durante a criopreservação ocorre movimento de translocação da estrutura desses fosfolípides, externalizando a fosfatidilserina, e a esse movimento, dá-se o nome de “scrambling” dos lipídeos. Porém os mecanismos envolvidos no “scrambling”, na fosforilação da tirosina e efluxo de colesterol observados nos espermatozoides criopreservados, diferem-se dos para capacitação. Dessa forma, assim como na capacitação, a criopreservação leva a membrana a um maior estado de fluidez e exposição de sítios de ligação a moléculas externas, facilitando ou requerendo menor tempo para a célula se capacitar (Thomas, 2006).

Injúrias ocorridas nas membranas plasmáticas e acrossomais (interna e externa) ou nas membranas mitocôndriais dos espermatozoides, ocasionadas pelo processo de criopreservação, podem ser decorrentes de alterações na temperatura e ou na osmolaridade do meio, provocando mudanças morfológicas na organização e ou na composição dos lipídios das membranas espermáticas podendo, em consequência, haver prejuízos na condição de fecundação dos mesmos (Celeghini, 2005).

A membrana plasmática exerce papel fundamental na sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea e na manutenção de sua capacidade fecundante, visto que garante a homeostase celular, sendo esta condição essencial para a manutenção da viabilidade desta célula. As mitocôndrias localizadas na peça intermediária dos espermatozoides são responsáveis pela produção de adenosina

trifosfato (ATP) que ativa os batimentos flagelares, propiciando alta motilidade (percentual) e forte vigor dos mesmos. Por outro lado, o acrossoma é indispensável para a fertilização pela liberação de enzimas como a hialuronidase e acrosina, no processo de penetração na zona pelúcida do oócito. Dessa forma, as modificações ocorridas nestas membranas (plasmática, acrossomal e mitocôndrial) durante a criopreservação, quando esta é feita sem rigoroso critério técnico, podem causar como conseqüências, prejuízos na motilidade espermática ou na penetração, pela menor produção de ATP, com diminuição da capacidade fecundante, ou até a morte celular (Celeghini, 2005).

A membrana celular experimenta uma série de estresse durante os processos de congelamento e descongelamento do sêmen. Dentre estes, incluem-se a desidratação, a formação da micela invertida, a formação dos cristais de gelo intracelular, originados pela elevação da concentração de cristais extracelular adquiridos no processo de congelamento do sêmen, além de alterações estruturais e bioquímicas na bicamada lipídica (Parks e Graham, 1992).

Esta membrana celular é formada basicamente por bicamada lipídica, com algumas proteínas centrais e outras periféricas, sendo glicoproteínas e glicolipídeos, organizados num mosaico fluido (Singer e Nicholson, 1972).

Quando esta bicamada lipídica está sujeita a certa temperatura, observa-se em consequência, alteração do tipo hexagonal, sendo um rearranjo estrutural que pode desestabilizar a membrana plasmática, e fazer com que esta perca a sua função de permeabilidade, durante a fase de transição gel - cristalino (Parks e Graham, 1992).

Os lipídios e as proteínas não estão ligados, a cada lado da membrana, por ligação covalente, que permite livre fluidez das

proteínas, que se movimentam constantemente, mas dependem do estágio de fluidez da membrana. Assim sendo, a membrana ao passar pela fase de transição gel – cristalina, permite que as proteínas se desloquem para a região mais fluída da membrana (que ainda não se cristalizou, no processo de resfriamento), permitindo que os lipídios dessa região invertam sua posição polar-apolar. Essa inversão dos lipídios permite a formação de poros na membrana fazendo com que esta perca sua função de permeabilizar a célula, tornando-a vulnerável à perda e entrada de íons, descontrolando seu equilíbrio osmótico (Parks e Graham, 1992; Watson, 1995).

Danos à membrana podem ocorrer pela desidratação excessiva e ou pela formação de cristais de gelo intracelular, através de uma taxa de resfriamento lento. Esses danos podem ocorrer durante os processos de congelamento e descongelamento em temperaturas que variam de  $-15$  a  $-60$  °C e não durante a estocagem no nitrogênio líquido. A membrana plasmática age como barreira, assim como os crioprotetores dos diluidores atuam como agentes osmóticos ativos, prevenindo o crescimento de cristais de gelo dentro da célula. O aumento da concentração destes cristais em razão do congelamento da água aumenta o gradiente osmótico, difundindo mais água do meio intracelular para o extracelular, desidratando a célula e a própria membrana plasmática (Parks e Graham, 1992; Watson, 1995).

Cristais intracelulares podem ser formados, em razão da rápida taxa de resfriamento. Um resfriamento muito lento, por outro lado, pode levar à desidratação celular muito intensa, sendo ambas as situações indesejáveis (Parks e Graham, 1992). Assim sendo, a taxa de resfriamento ideal deve ser relativamente rápida (mas sem excesso), que resulte em suficiente e não excessiva retirada de água do meio externo para dentro da célula. Em decorrência, somente seriam formados cristais intracelulares pequenos e

não letais, que proporcionam boa condição de sobrevivência à célula após sua congelação e ao seu reaquecimento. Em geral, quando o resfriamento é feito com taxas mais rápidas, a descongelação também deverá ser rápida (Watson, 1995).

Espermatozóides submetidos à congelação-descongelação de forma intempestiva, podem apresentar grandes cristais de gelo próximo às mitocôndrias, podendo haver, após a descongelação, perdas de seu conteúdo estrutural, pela lesão direta dos cristais na membrana comprometendo a taxa de respiração e concomitante produção de ATP pela fosforilação oxidativa, realizada na membrana mitocôndrial interna, ocasionando queda no vigor e na motilidade espermática (Watson, 1995).

Em razão da queda no metabolismo celular, adquirida com a queda da temperatura, as bombas de sódio e potássio também terão seus metabolismos diminuídos, o que leva à diminuição da produção de ATP, causando descontrole iônico da célula, o que pode acarretar a entrada do íon cálcio para o interior da célula e ativar fosfolipases, que também causam lesão nas membranas dos espermatozóides (Parks e Graham, 1992; Watson, 1995).

Uma maior ou menor resistência da membrana plasmática do espermatozóide ao processo de criopreservação, tem sido notada entre as espécies dos animais domésticos, pela maior presença de colesterol ou quanto ao grau de saturação dos mesmos (Parks e Graham, 1992).

### **2.2.2 - Capacitação**

Os espermatozóides ejaculados dos mamíferos não são capazes de fecundar oócitos, mesmo apresentando motilidade e aparente normalidade morfológica. Eles adquirem esta capacidade no trato genital feminino num processo tempo dependente, denominado de capacitação (Lamirande et

al., 1997). Este fenômeno está relacionado à mudanças bioquímicas e fisiológicas das membranas plasmáticas destas células, permitindo haver interações entre espermatozoides e ovócitos (Senger, 2003). Tais mudanças fundamentam-se na remoção ou alteração de estabilizadores, proteínas e glicídios que compõem o glicocálix, ou fatores protetores da membrana, adquiridos durante o trânsito pelo epidídimo ou exposição ao plasma seminal, os quais levariam esta à condição propícia para a fertilização (Senger, 2003). Esses agentes decapacitantes protegem a célula de uma capacitação precoce (Gadella et al, 2001).

Mudanças nos componentes das membranas espermáticas seguem-se progressivamente pela perda de proteínas ou redução de seu peso molecular, através da remoção do glicocálix por fricção do muco cervical, redução da proporção de colesterol/ fosfolípido, aumento da mobilidade lateral e ou ainda pela desordem de lipídios e proteínas (Gadella et al., 2001; Thomas et al, 2006). As proporções de colesterol / fosfolípidos nas membranas plasmáticas e acrossomal externa diminuem, aumentando sua fluidez e, o efluxo de colesterol ocorre em decorrência de sua transferência para albuminas e lipoproteínas de alta densidade da tuba uterina. Essa molécula tem a importante função na estabilização destas membranas. Essa desestabilização, provocada pela remoção do colesterol, promove a reorganização dos componentes da bicamada, incluindo redistribuição de proteínas integrais (Gadella, 2001).

O exato mecanismo pelo qual ocorre a capacitação não é conhecido (Lamirande et al., 1997). A função desse mecanismo é fornecer a fluidez necessária para que ocorram hiperativação da motilidade e fusão entre as membranas plasmática e acrossomal externa, denominada de vesiculação, culminando na reação acrossômica (Lamirande, 1997; Senger, 2003). Sabe-se que algumas substâncias presentes nas

secreções do útero e da tuba uterina desencadeiam esse processo. Dentre outras, destacam-se o bicarbonato, a albumina, a progesterona, o íon cálcio, os glicosaminoglicanos e espécies oxigênio reativos, originados pelo ambiente uterino interno e da respiração do espermatozoide pelas suas mitocôndrias (Lamirande et al., 1997; Flesh e Gadella, 2000).

O bicarbonato ativa uma forma solúvel de adenilil ciclase (AC), específica dos espermatozoides. O resultado é o aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) que estimula a proteína quinase A (PKA) que, por sua vez, induz a fosforilação de tirosina de vários substratos, permitindo que esta ao metabolizar várias proteínas da matriz extracelular e da membrana, expor sítios de ligação à zona pelúcida (Gadella, 2001), predispondo a célula à reação acrossômica, à capacitação, que são portanto, um mecanismo limitante da reação (Lamirande et al., 1997). Alguns autores também reportam que esse íon também ativa o movimento de “scrambling” dos fosfolípidos de membrana (Thomas, 2006).

A albumina está relacionada à redistribuição e extração do colesterol da membrana, aumentando assim sua atividade fusogênica e permeabilidade iônica, predispondo a célula à reação acrossômica e hiperativação da motilidade (Lamirande et al., 1997; Flesch e Gadella, 2000). O progesterona estimularia a capacitação pela indução do “scrambling” e ativação dos canais de cálcio (Lukoseviciute et al., 2005).

O cálcio estimula também a AC num mesmo mecanismo, como o bicarbonato, até aumentar os níveis de AMPC, o qual na peça intermediária dos espermatozoides inicia a hiperatividade, que é uma forma de movimento vigoroso e circular que aumenta a chance desta célula se encontrar com o oócito (Lamirande et al., 1997; Senger, 2003). Esse íon também ativa outro sistema, que é o fosfatidil inositol, que estimula a

proteína knase C, que por sua vez, atua nas fosfolipases A2, levando a produção de prostaglandinas e leucotrienos pelo ácido aracídico, regulando a entrada do cálcio na célula, e modificando o citoesqueleto, preparando-a para a reação acrossômica (Breitbart, 1997).

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são carboidratos, que estão presentes na matriz extracelular, e são componentes integrais de membranas celulares. Tem sido identificado no trato reprodutor feminino, obstruindo receptores, para regular a viabilidade de substratos e de fatores de crescimento. Dentre outras as mais conhecidas são a heparina, o ácido hialurônico, o sulfato de heparan e sulfato de condroitina B (Ax e Lenz, 1987).

Os proteoglicanos, assim como outros componentes da matriz extracelular, influenciam a adesão, motilidade, proliferação, crescimento e diferenciação de muitas células (Ratner et al., 1985). Estes proteoglicanos da matriz extracelular tem como parte central os glicosaminoglicanos (GAGs), envolvidos também na fertilização na maioria das espécies. Em bovinos os GAGs semelhantes a heparina do oviduto, participam na capacitação do espermatozóide do touro (Parrish et al., 1988; Parrish et al., 1989; Ax e Lenz, 1987). A capacitação espermática ocorre no trato reprodutivo feminino, sempre diante de altas concentrações de GAGs do fluido folicular ovariano, ou de outras fontes, sendo sempre pré requisito para a reação acrossômica. A heparina é estruturalmente similar aos GAGs do fluídos do oviduto, desempenhando também estímulo fisiológico semelhante para promover a capacitação do espermatozóide bovino (Parrish et al., 1989). Estudos sugerem que a função de GAGs, especialmente a heparina, neste evento, seja através do aumento do pH intracelular, no aumento da entrada de cálcio na célula, na fosforilação da tirosina (Parrish et al., 1988; ), e no “scrambling” dos fosfolípidos

(Lukoseviciute et al., 2005), mas que o específico mecanismo, ainda não esteja totalmente conhecido.

A ligação da heparina ao espermatozóide é saturável (receptor com pontos de ligação), reversível e dependente do pH, da temperatura e nível de  $Ca^{++}$ . A concentração de heparina necessária para a capacitação é semelhante ao requerido para saturar os pontos de ligação (Miller et al., 1990).

A capacitação do espermatozóide bovino estimulada pelos GAGs, passa por processo de maturação induzida pelo plasma seminal (Lee et al., 1985; Florman e First, 1988), visto que o plasma seminal aumenta os locais de ligação da heparina no espermatozóide epididimal (Lee et al., 1985), por proteínas ligadoras presentes em seu conteúdo (Miller et al., 1990). Tais proteínas são essenciais no processo de fecundação, sendo que com a sua presença, ou ausência, pode haver interferência na fertilidade do touro. Dentro deste contexto, vários estudos têm mostrado a existência de proteínas do plasma seminal, que se prendem a membrana espermática, facilitando a ligação com a heparina e/ou outros GAGs presentes no trato reprodutivo da fêmea, estimulando, a capacitação do espermatozóide (Miller et al., 1990; Salvador, 2005).

O papel regulatório das proteínas com afinidade a heparina (PAH) sobre a capacitação do espermatozóide bovino, tem sido evidenciado. A afinidade pela heparina e a sua ligação com o espermatozóide pós-epididimário se dá através das proteínas de 14-18 KDa, ou das de 24 e 31 KDa, todas do plasma seminal, identificadas utilizando-se a técnica de *Western blots*. Apesar destes resultados positivos, os dados tem sido contraditórios, porque as proteínas isoladas foram ineficientes para estimular a ligação à zona pelúcida e aumentar a reação acrossômica induzida (Miller et al., 1990).

Contudo, as opiniões dos autores são divergentes sobre a real função da heparina, e os GAGs, na qual, se estes exerceriam influência, somente, na capacitação (Parrish et al., 1988), ou se essas substâncias também têm efeito direto na reação acrossômica (Lenz et al., 1987).

Como todas as células sob condições aeróbicas, os espermatozoides são capazes de gerarem radicais livres, em sua maioria originada de atividade metabólica normal, e, em menor proporção, pela fosforilação de proteínas no ambiente uterino interno durante a capacitação. Radicais livres como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, induzem hiperativação, fosforilação da tirosina e agonistas dos receptores de progesterona (Lamirande et al., 1997; Ball et al., 2002).

### **2.2.3 - A reação acrossômica e fecundação**

As mudanças ocorridas nas membranas espermáticas durante o processo de capacitação, permitem que haja hiperativação da motilidade espermática, o reconhecimento específico entre a célula espermática e a zona pelúcida do oócito e a fusão das membranas plasmáticas dos gametas (Salvador, 2005).

A capacitação ocorre no trato genital feminino pela remoção de componentes decapacitantes dos espermatozoides, adquiridos na maturação espermática e de grande importância para que os mesmos não sofram reação acrossômica precoce, ainda sem as modificações morfológicas essenciais, mas somente as bioquímicas, que resultam em instabilidade (fluidez) da membrana plasmática e hiperativação espermática, condições essenciais para que ocorram a reação acrossômica (RA) e a penetração do espermatozoide no oócito (Gonçalves et al., 2002). Para que a RA ocorra é necessário que haja a capacitação espermática, promovida pela perda de colesterol da parte acrossômica na cabeça do

espermatozoide, alterando sua estabilidade permitindo o influxo de cálcio, necessário para que ocorra a RA (Moore e Bedford, 1983).

Na presença do cálcio extracelular, o gameta masculino capacitado tem a habilidade de se ligar à zona pelúcida do oócito, dando início a reação acrossômica, atuando como agente desestabilizador da membrana, ativando as fosfolipases e facilitando a vesiculação, alterando ainda mais a permeabilidade da membrana (Gonçalves et al., 2002; Salvador, 2005).

A ligação do espermatozoide ao oócito é mediada por receptores espermáticos espécie – específicos presentes na zona pelúcida. As glicoproteínas constituintes da zona pelúcida (identificadas inicialmente em camundongos) são denominadas de ZP1, ZP2 e ZP3, que apresentam importantes funções na fecundação. A ZP1 tem basicamente um papel estrutural, enquanto tem sido atribuída a função de receptor secundário à ZP2, e de receptor primário à ZP3, sendo que este último tem sido responsabilizada pela reação do acrossoma. O espermatozoide penetra na zona pelúcida por ações enzimáticas e mecânicas. A reação acrossômica permite a liberação de enzimas que digerem a matriz da zona, para a penetração do gameta na zona pelúcida, auxiliada pela hipermotilidade espermática (Gonçalves et al., 2002; Senger, 2003). Essa hipermotilidade é adquirida na ampola da tuba uterina, onde a motilidade do espermatozoide passa de retilínea progressiva, para um movimento circular, que facilita ao espermatozoide entrar em contato com o oócito. Essa hipermotilidade acredita-se ser adquirida através de moléculas específicas presentes no epitélio das ampolas da tuba uterina (Senger, 2003).

A RA tem duas finalidades principais: tornar o espermatozoide hábil para penetrar na zona pelúcida e expor o seu segmento equatorial, para que ocorra a fusão entre as

membranas dos gametas. A célula espermiática contém proteínas específicas na membrana acrossômica, que se ligam especificamente em proteínas da zona, que são expostas durante o processo de capacitação. Dessa forma, proteínas da membrana plasmática do gameta masculino se ligam a outras da superfície da zona do gameta feminino (ZP3), para se iniciar o processo de RA. Esta reação começa formando múltiplos pontos de fusões entre a membrana plasmática do gameta masculino e a sua membrana acrossomal externa, formando várias vesículas que contém o conteúdo enzimático. A esta fase dá-se o nome de vesiculação e caracteriza a RA. Dentre essas enzimas destacam-se a hialuronidase e a acrosina, que hidrolisam a matriz da zona, facilitado pela hipermotilidade espermiática, o que permite a passagem do gameta para o espaço perivitelino (espaço entre a zona pelúcida e a membrana do gameta feminino) (Bazer et al, 1995; Gonçalves et al., 2002 e Senger, 2003).

A fusão do oócito com o espermatozóide ocorre após a penetração, especificamente pelo contato entre o segmento equatorial do gameta masculino e a membrana plasmática do gameta feminino. A membrana vitelina (membrana plasmática do gameta feminino) participa ativamente nesse processo e, dessa forma, o espermatozóide é incorporado pelo ooplasma. O oócito ativado pela presença do espermatozóide responde inicialmente com a despolarização da membrana plasmática, hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>), com o aumento das oscilações intracelulares de cálcio, exocitose dos grânulos corticais, aumento do pH intracelular e síntese protéica (Gonçalves et al., 2002).

Os mecanismos pelos qual essa reação ocorre somente na região apical ainda não estão totalmente esclarecidos, mas parece estar relacionados à menor concentração de colesterol, maior concentração de lipídios

aniônicos e a diferenças antigênicas entre as membranas externas apicais do acrossoma e da zona equatorial que promoveriam maior fluidez daquele segmento (Moore e Bedford, 1983).

Para impedir a penetração de mais de um gameta (polispermia), observa-se rápida despolarização da membrana vitelina após a fecundação, fenômeno denominado de bloqueio vitelínico. Outro bloqueio (secundário) resulta da reação cortical, após a penetração espermiática, que envolve a fusão da membrana plasmática do oócito, com a membrana dos grânulos corticais. Essa fusão é propagada como uma onda, envolvendo toda a superfície do oócito, a partir do ponto da fusão espermatozóide - oócito. O conteúdo dos grânulos corticais possui enzimas como as hidrolíticas, proteinases e peroxidases, que são depositadas no espaço perivitelino, provocando hidrólise parcial das proteínas da zona pelúcida, sendo transformadas em ZP1F, ZP2F e ZP3F. Os sacarídeos da zona pelúcida também sofrem alterações por ação das glicosidases, liberadas dos grânulos corticais. Com essas modificações, a zona pelúcida perde receptores espermiáticos e tornam-se mais resistentes à digestão enzimática, impedindo também a penetração de outros gametas, o que poderia provocar polispermia, impedindo a clivagem e o desenvolvimento embrionário (Gonçalves et al., 2002).

### **2.3 – Métodos de avaliação de sêmen**

Em razão do alto custo e demanda de tempo para testar sêmen a campo, pesquisas têm sido realizadas para obter um método de avaliação simples e acurado para predizer e ranquear o potencial fértil de uma determinada amostra. Sabe-se também que nenhuma característica seminal é altamente correlacionada com fertilidade. As variáveis para avaliar a qualidade seminal (volume, motilidade, concentração e morfologia) possuem limitações para predizer a taxa de

prenhez, embora, sejam eficazes para eliminar amostras de pobre potencial de fecundação (Christensen, 1999; Zhang et al., 1999; Rodríguez-Martínez, 2003).

O espermatozóide é uma célula complexa e de alta especialização, podendo tornar-se incapaz para a fecundação, quando um ou mais dos aspectos bioquímicos (ou morfológicos) tornam-se alterados (Jeyendran et al., 1984). Normalmente, a avaliação de somente um destes aspectos, não garante a condição de normalidade dos outros, sendo o mais indicado é a combinação de vários destes fatores, em análise multifatorial, para o diagnóstico com maior acurácia confiabilidade, da funcionalidade desta célula pós-congelamento (Christensen et al., 1999; Melo, 1999; Zhang et al., 1999; Rodríguez-Martínez, 2003). Neste contexto, Zhang et al (1999), ao trabalharem com sêmen de touros da raça Sueca Vermelha de 11 a 13 meses de idade, e ao utilizarem avaliação pós descongelamento envolvendo motilidade, vigor, morfologia e testes funcionais, como características de sêmen pós “swim-up”, teste de ligação a zona pelúcida e FIV, não conseguiram prever a prenhez a campo de forma significativa, em regressão simples. Nas análises de regressão múltipla, utilizando como variáveis explicativas todos os resultados dos testes na fórmula gerada pela análise, explicou 94 % ( $R^2 = 0,94$ ,  $p < 0,001$ ) da variação da taxa de prenhez.

Amostras de sêmen apresentam grande variabilidade quando testados “in vivo” (avaliados pela taxa de não retorno aos 56 dias), “in vitro”, e na TE (Blottner et al., 1990; Popwell e Flowers, 2004). Nesse contexto, tem-se empregado testes funcionais em sêmen criopreservado como o Thos, o TTR, as sondas fluorescentes, a RAI, a avaliação da estrutura da cromatina, penetração em muco cervical, proteínas do sêmen e outros, para melhor avaliar a integridade funcional e estrutural das membranas plasmática, mitocôndrial e

acrossomática, pós-congelamento, na tentativa de separar amostras de sêmen, com melhores probabilidades para se prever altos índices de prenhez (Zhang et al., 1999; Rodríguez-Martínez, 2003; Celeghini, 2005). As técnicas utilizadas podem ser indicadas não somente para o uso no FIV, mas também para indicar touros de alta fertilidade para uso na IA, ou na MN (Feliciano Silva, 1998).

## 2.4 – Avaliação Andrológica

A avaliação do sêmen é de grande importância tanto para exame andrológico, para a seleção de touros, quanto para a avaliação espermática após o congelamento do sêmen. A avaliação da fertilidade do touro depende de uma série de fatores associados entre si. Estes fatores vão desde os aspectos comportamentais, passando pelos exames clínicos, dos órgãos genitais, avaliação física e morfologia do sêmen e da biometria testicular (Vale Filho et al, 1994).

Ressalta-se que a seleção andrológica preliminar jamais poderá ser substituída ou eliminada do processo de escolha e seleção de touros de normal fertilidade, uma vez que os exames andrológicos de rotina são os passos iniciais para qualquer outro exame complementar de predição da fertilidade em bovinos (Salvador, 2005).

Exames de rotina, após a coleta, são realizados para avaliar os parâmetros quantitativos e qualitativos do sêmen. Os parâmetros quantitativos são a avaliações do volume, concentrações e o número total de espermatozóides. Os qualitativos são a aparência, motilidade, vigor, turbilhonamento e morfologia (Christensen, 1999; Zhang, 1999; Rodriguez-Martinez, 2003).

A motilidade espermática é provavelmente a avaliação mais comumente realizada. Os resultados são subjetivos e é necessária uma boa experiência do examinador para uma

avaliação confiável. Entretanto, a porcentagem de espermatozóides móveis avaliada visualmente, não é altamente correlacionada com taxa de prenhez (Phillips et al., 2004). A motilidade espermática é um dos principais métodos de avaliação do sêmen criopreservado constituindo-se num dos elementos mais importantes na estimativa da viabilidade espermática (Gadella, 2001).

Phillips et al. (2004), ao trabalharem com vários parâmetros da qualidade do sêmen e comparou com as taxas de não retorno, taxa de fecundação “in vitro” (avaliada por taxa de clivagem e de blastocisto) e taxa de prenhez, sugeriram que a única característica que se correlacionou significativamente com esses atributos foi a porcentagem de espermatozóides normais, avaliada pela morfologia.

Quanto à morfologia, existe grande variedade de métodos e sistemas de classificação morfológica. As características morfológicas dos espermatozóides podem ser avaliadas por meio de suspensões fixadas em formol-salino na microscopia de contraste de fase ou por meio de esfregaços corados (eosina-negrosina, vermelho congo/violeta genciana) na microscopia óptica comum. Em alguns sistemas de classificação os defeitos são classificados em defeitos primários e secundários, de acordo com a origem presumida dessas anormalidades. Os defeitos primários são considerados originados durante a espermatogênese, enquanto os secundários desenvolvem-se no armazenamento, na passagem pelo trato reprodutivo e na adição da secreção das glândulas acessórias (Juhász et al, 2000). Blom (1973) simplificou esta classificação em defeitos maiores e defeitos menores de acordo com a importância dessas anormalidades para a fertilidade.

Dentro deste contexto, o sistema CAP (Classificação andrológica por pontos) tem sido utilizado com sucesso no Brasil. Este

sistema originado do modelo norte-americano BSE (Breeding Soundness Evaluation) e pode ser utilizado para a seleção tanto de touros *Bos taurus taurus*, quanto de *Bos taurus indicus*. Nesta classificação levam-se em consideração aspectos físicos (motilidade e vigor), aspectos morfológicos e a circunferência escrotal (CE), em função da idade cronológica do animal (Vale Filho, 1988).

A CE é uma importante característica aferida em touros de corte, quando se pretende monitorar a precocidade e a fertilidade de um rebanho. Touros com maior CE geralmente produzem maior quantidade e qualidade de espermatozóides em animais jovens. Esta característica apresenta herdabilidade moderada a alta e correlaciona-se negativamente com a idade à puberdade das filhas do touro. Considerando que a idade a puberdade das fêmeas está associada favoravelmente à posterior produção, selecionar touros de maior tamanho testicular, otimiza-se a fertilidade do rebanho (Freneau, 2006).

Para avaliação de sêmen pré e pós congelamento a motilidade retilínea progressiva, deve ser de no mínimo 60% e 30%, respectivamente, o vigor (1-5): 5, os defeitos maiores e totais não exceder de 15% e 30%, para ambos (CBRA, 1998).

## 2.5 – Teste Hiposmótico (Thos)

O teste hiposmótico que é um tipo de teste utilizado para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide, baseia-se no fato de que o transporte de fluidos ocorre normalmente através da membrana plasmática íntegra, sob condições hiposmóticas, até que o equilíbrio seja alcançado. Em razão do influxo de fluidos, a célula se expande e torna-se túrgida, principalmente na membrana do ápice da cauda, dando origem a caudas enroladas na extremidade, podendo ser identificadas facilmente em microscopia de contraste de

fase (Jeyendram et al., 1984). No entanto, a passagem de fluidos através da membrana é apenas um dos atributos fisiológicos dentre muitos dessa estrutura. Corantes de exclusão vital (como os fluorescentes, azul tripan, eosina nigrosina) podem ser utilizados para avaliar a integridade estrutural da membrana. Desta forma um teste não substitui o outro, mas devem ser utilizados em conjunto, havendo uma correlação de média magnitude com Thos, e de baixa magnitude com parâmetros de motilidade, vigor e morfologia espermática (Jeyendran et al., 1984; Vazquez et al., 1996; Brito et al., 2003). No entanto, existe uma variabilidade encontrada pelos autores entre o Thos e fertilidade “in vivo” e “in vitro” (Jeyendran et al., 1984; Correa et al., 1997; Rota et al., 1999; Brito et al., 2003). Jeyendran et al. (1984) encontraram correlação de 0,90 entre espermatozóides que reagiram ao teste e taxa de penetração na zona pelúcida. Rota et al. (1999) e Brito et al., 2003 não encontraram correlação ( $p > 0,05$ ) entre o Thos e taxa de clivagem, mórula ou blastocisto, enquanto Correa et al. (1997) encontraram correlação de 0,57 ( $p < 0,05$ ) entre o Thos e índice de prenhez (IP).

Para a metodologia do Thos, após as contagens das alterações morfológicas da cabeça, do acrossoma, da peça intermediária e cauda dos espermatozóides na amostra de sêmen, que não foram submetidas ao Thos (Blom, 1973), faz-se a leitura para o mesmo, contando-se todos os espermatozóides com alterações na cauda do espermatozóide, sendo consideradas normais, pois a membrana dos mesmos, em condições hiposmóticas, é capaz de reter e transportar água proveniente do meio, sendo subtraídos pelas alterações nas caudas dos mesmos antes do Thos (Melo, 1999).

## **2.6 – Teste de Termoresistência (TTR)**

Um dos fatores responsável pela queda de fertilidade em sêmen criopreservado é o

diminuído período de sobrevivência dos espermatozóides após o descongelamento, decorrido de perda de estruturas celulares e qualidade das membranas, ocorridas com o congelamento-descongelamento das células (Silva et al., 2006). Portanto, com a maior difusão e uso de sêmen bovino congelado nos processos de I.A., T.E. e F.I.V., surgiram recomendações para testes envolvendo resistência metabólica espermática, pela exposição de amostras de sêmen ao calor contínuo a 38° C, por cinco horas, supondo a mesma condição de que estes estariam no trato genital da fêmea (Arruda, 1988).

Ludwick et al. (1948) observaram correlação ( $p < 0,05$ ) entre a fertilidade a campo e a persistência da longevidade (persistência de motilidade e vigor) de espermatozóides bovinos a 38°C, durante 5 horas.

O TTR pode ser lento ou rápido. A prova lenta consiste em descongelar o sêmen em banho-maria a 38 °C por 30 segundos, sendo este mantido em tubo de ensaio a 38 °C, durante quatro ou a cinco horas, continuamente. Na prova rápida descongelase o sêmen da mesma maneira, sendo mantido em tubo de ensaio por 45°C, durante 15 a 30 minutos. Nos dois casos, em intervalos de 15 a 30 minutos, fazem-se avaliações subseqüentes para se detectar, as quedas sucessivas da motilidade e o vigor espermático. Amostras de sêmen de alta qualidade podem permanecer até quatro horas contínuas após o início do TTR iguais a quando se iniciou o teste (Jondet, 1980).

Arruda (1988) não verificou diferenças ( $p > 0,05$ ) na taxa de prenhez ao primeiro, segundo e terceiro estros, para os tratamentos TTRr, ou TTRl em amostras padrões, que no final dos testes, apresentaram-se acima de 20% de motilidade espermática.

## **2.7 – Reação acrossômica induzida (RAI)**

Este método foi adaptado e desenvolvido pelo Laboratório de Reprodução da EMBRAPA, visando principalmente selecionar touros potencialmente mais férteis, dentre aqueles geneticamente superiores, utilizados na IA, TE, FIV e também na MN. Este método permite complementar, com maior segurança, os exames andrológicos de rotina (Feliciano Silva, 1998). Os meios indutores da RAI mais comumente utilizados são a heparina e o cálcio ionóforo, que em touros, a primeira mostrou-se mais eficiente (Assumpção et al., 2002).

Salvador (2005) e Blottner et al., (1990), observaram grande variabilidade na resposta de touros à porcentagem de espermatozoides que reagem ao RAI. Isso pode ser explicado pela exigência individual de concentração de heparina no meio indutor de capacitação (Gonçalves et al., 2002), ou ao grau de lesão aos receptores de heparina, adquiridos no processo de criopreservação, ou de proteínas ligadoras de heparina, presentes no plasma seminal (Januskauskas et al., 2000).

Não foram encontradas correlações ( $p > 0,05$ ) entre RAI e a maioria das características andrológicas do sêmen pré-congelamento, ou proteínas totais no touro, porém correlação negativa e de média magnitude ( $r = -0,51$ ) foi encontrada com a Mot Pós. Com a CAP encontrou-se correlação negativa e de média magnitude ( $r = -0,47$ ), o que mostra baixa associação entre características físicas e morfológicas do sêmen, e a RAI (Salvador, 2005). Alta variação na literatura foi observada com relação a associação entre a RAI e taxa de prenhez a campo, sendo que Januskauskas et al. (2000) e Assumpção et al. (2002), por exemplo, não encontraram associações, enquanto Lenz et al. (1987) e Ax e Lenz (1987); Whitfield e Parkinson (1992) e Whitfield e Parkinson (1995) reportaram altas correlações, e Blottner et al. (1990), observaram correlações de média magnitude.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### Localização, clima e descrição da propriedade

Os tourinhos da raça Tabapuã foram selecionados através de exame clínico-andrológico, tendo permanecidos do nascimento à idade adulta na fazenda Araguaia, município de Lajedão (BA), no extremo sul do estado. Os animais foram criados em regime de pasto, com suplementação na seca, até a idade de dois anos, época das colheitas das aliquotas de sêmen destinadas a criopreservação, e a este experimento.

O clima da região é quente e úmido, com temperaturas e precipitações que apresentam ciclos bem definidos, com média anual de 1200 mm e temperaturas máxima e mínima de 30,8 °C e 19 °C, respectivamente (IBGE, 2004).

A fazenda possui área de 1000 ha. com pastagens predominantes de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*, e seu rebanho é formado de 1100 animais da raça Tabapuã PO e LA, havendo 500 matrizes em reprodução, sendo fecundadas em sistema de IA, onde são obtidos os tourinhos destinados para a venda.

#### Seleção Andrológica

Os tourinhos Tabapuã foram examinados quanto aos aspectos clínico-andrológicos e de qualidade do sêmen (CBRA, 1998), tendo sido feita a determinação da CAP (Vale Filho, 1988; 1989). De um total de 140 animais, dezoito deles foram destinados a criopreservação, durante um período de média de 23,7 meses. Desses 18, apenas 12, seguiram as análises do presente estudo, pois foram os que obtiveram as recomendações do CBRA (1998), para características do sêmen bovino pós-criopreservação.

As colheitas de sêmen foram realizadas com

auxílio de um aparelho eletroejaculador e as avaliações físicas (motilidade, vigor e turbilhonamento) dos espermatozóides realizadas imediatamente após as ejaculações. Para a avaliação morfológica, foi utilizada a solução de formol-salino tamponada (Hancock, 1957), transportada em temperatura ambiente e realizada no Laboratório de Andrologia da Escola de Veterinária da UFMG (CBRA, 1998).

Os animais, cujo sêmen foi destinado à criopreservação, foram aqueles que obtiveram < 15% de defeitos maiores e < 25% de defeitos totais, e que obtiveram no momento da coleta  $\geq$  que 60% de motilidade espermática progressiva retilínea (Mot Pré), com vigor (1-5) = 5 (CBRA, 1998). A congelamento do sêmen foi realizada de acordo com Abreu (2002) (comunicação pessoal). Após estas análises o sêmen foi diluído (1:1 sêmen/diluidor) e envasado em palhetas tipo francesa, 0,5 ml, com o diluente descrito por Nagase e Niwa (1964), sendo de 11 % de solução mãe de lactose a 10 %, 6 % de glicerina, 20 % de gema de ovo, 1 mg/ml de estreptomicina e 1 milhão UI/ml de penicilina potássica, com posterior resfriamento e equilíbrio por um período de seis a oito horas a 5 °C.

Após a fase de equilíbrio, a congelamento do sêmen foi realizada, depois das palhetas permanecerem por 15 minutos em vapor de nitrogênio líquido a -80 °C, e posterior imersão no mesmo. Trinta doses de sêmen foram congeladas para cada tourinho selecionado. Os critérios, para aprovação do sêmen bovino pós-congelamento, foram de acordo com as recomendações do CBRA (1998). A concentração espermática por dose envasada de sêmen por palheta foi de 20 milhões de espermatozóides viáveis, pós-descongelamento.

### Testes Funcionais

Os testes funcionais utilizados foram: (1) o hiposmótico (Thos); (2) a reação

acrossômica induzida por heparina (RAI); (3) o teste de termorresistência (TTR) e do índice de prenhez na primeira IA (IP).

A metodologia para o Thos, consistiu na mistura de uma alíquota de 30 microlitros ( $\mu$ l) de sêmen em 300  $\mu$ l de solução contendo citrato de sódio e frutose, a 75, 100 e 125 mOsmol/ml, mantida a 37°C por 1 hora em banho maria. Todas as soluções preparadas foram medidas em osmômetro, para averiguar a osmolaridade. Após este período as amostras foram fixadas em 0,5ml de solução formol - salino tamponada, para leitura em microscopia de contraste de fase (Brito et al., 2003). A interpretação procedeu da seguinte forma: o total de caudas dobradas após o Thos foi subtraído do total de espermatozóides com caudas dobradas antes da incubação, em solução hiposmótica (Correa et al., 1997; Melo, 1999).

Na RAI o material descongelado e contendo sêmen com diluente foi lavado por centrifugação em meio TALP HEPES (albumina 6mg/ml,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, KCl, 3,1 mM,  $\text{MgCl}_2$  0,4 mM, NaCl 100 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,3 mM, Lactato de sódio 21,6 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 Mm, Piruvato de sódio 1 mM), por três vezes a 300g por 10 minutos, para a retirada do diluente. A concentração espermática foi padronizada para todos os touros em 20 milhões de espermatozóides/ml. Após esse procedimento, o sêmen foi incubado em três tratamentos sugeridos por Feliciano Silva (1998):

(1) 250  $\mu$ l sêmen + 750  $\mu$ l Talp (controle) incubados por 4 horas e 15 minutos;

(2) 250  $\mu$ l sêmen + 650  $\mu$ l Talp + 100  $\mu$ l de heparina, incubados por 4 horas e 15 minutos;

(3) 250  $\mu$ l sêmen + 550  $\mu$ l Talp + 100  $\mu$ l de heparina + 100  $\mu$ l de Lisofosfatidilcolina (LPC) adicionado depois de 4 hs, permanecendo por até 15 minutos de incubação;

Após estas incubações e no tempo zero o sêmen foi avaliado pelo método azul tripan/ giemsa adaptado de Feliciano Silva (1998). Para tal, o giemsa comercial, na concentração de 0,8 % foi diluído em água destilada em 1:1, para ser utilizado diretamente sob esfregaço na lâmina, após incubação com o azul de tripan, deixando por um período de 60 minutos. O azul de tripan utilizado foi na concentração de 0,2 %, e incubado em banho maria por 15 minutos. A concentração de heparina usada foi a de 50 µg/ml e a de LPC foi de 100 µg/ml (Salvador, 2005).

A fórmula usada para interpretação da RAI foi a seguinte:

$$RAI = \frac{((F3/(F2+F3) \times 100) - ((C3/(C3+C2) \times 100)))}{1}$$

F3= % de vivos com acrossoma reagido após 4: 15 h de incubação;

F2= % de vivos com acrossoma íntegro após 4: 15 h de incubação;

C3= % de vivos com acrossoma reagido logo após descongelamento do sêmen;

C2= % de vivos com acrossoma íntegro logo após descongelamento do sêmen;

Para o TTR foram utilizados dois métodos: o TTRl e o TTRr. A prova lenta consistiu em descongelar o sêmen em banho-maria a 38 °C por 30 segundos, e posteriormente mantido em tubo de ensaio a 38°C, durante quatro horas. Na prova rápida, o sêmen após ser descongelado foi mantido em tubo de ensaio por 45 °C, durante meia hora. Nos dois casos, em intervalos de 15 a 30 minutos, foram realizadas avaliações para detectar as quedas sucessivas da motilidade e do vigor espermático. Após o final destes, amostras de sêmen foram fixadas em formol salina, para avaliação da morfologia espermática, depois das respectivas incubações (Jondet, 1980).

Os doze tourinhos tiveram o sêmen submetido ao IP e aos testes funcionais, classificados de acordo com parâmetros mínimos exigidos pelo CBRA (1998). O IP foi avaliado em novilhas artificialmente inseminadas (IA) com apenas uma dose de sêmen. Foram inseminadas 4 novilhas Nelore por touro Tabapuã, que foram mantidas numa fazenda de 300 ha, no município de Carlos Chagas (MG), com boas pastagens e aguada (*Panicum maximum* e *Brachiária decumbens*), e boa mineralização. As novilhas tinham 24 meses de idade e peso de 400 kgs, com escore corporal (1-9) = 6 no início do trabalho. Foram sincronizadas somente aquelas detectadas com ovulação, após avaliação clínica-ginecológica. O método de sincronização utilizado foi o de dupla aplicação de prostaglandina f 2α (ciosin®) intervaladas de 5 dias. A IA foi realizada de acordo com a detecção do cio. O diagnóstico de gestação foi efetuado 60 dias da IA, pelo método de palpação retal.

### **Análise dos dados**

As análises de variâncias das variáveis andrológicas e dos testes funcionais foram realizadas utilizando o programa Saeg (2004), comparações de médias, dependendo do modelo, foram realizadas pelo teste SNK, para variáveis paramétricas, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, para variáveis não paramétricas, utilizando o nível de significância de 5 %. Foram também estimados coeficientes de correlação (Pearson) entre as variáveis testadas, incluindo-se o IP. Finalmente foram ajustados modelos de regressão simples e múltipla para prever o IP em função dos testes funcionais e características andrológicas, utilizando também o programa Saeg (2004). A divisão dos grupos foi realizada segundo o IP (menor ou maior que a média) e também pela Mot Pós, maior ou menor que a média.

#### 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apresentam-se na TAB. 1 os perfis zootécnicos e andrológicos dos doze tourinhos Tabapuã usados nesse experimento, bem como os dados do sêmen pré e pós-congelamento. Observa-se que este grupo de tourinhos Tabapuã, aos dois anos de idade, apresenta sêmen com alta qualidade, no pré e no pós congelamento,

caracterizados pelas altas Mot Pós e Mot Pré (65,4 e 38,1%) e vigor (1-5= 5), e pela baixa quantidade de espermatozoides anormais no pré congelamento (DM e DT, 10,6 % e 16,0 %, respectivamente), sendo pois de se esperar alto IP, pelo uso na IA. O peso corporal, CE e CAP, foram respectivamente de 412,0 Kg; 31,2 cm e 80,8 pontos, sendo também considerados valores altos para a idade dos animais referidos.

Tabela 1 – Perfil zootécnico, andrológico e de congelabilidade do sêmen de doze tourinhos Tabapuã com dois anos de idade, criados a pasto, previamente selecionados pelo CAP e pela qualidade do sêmen pós criopreservação

Touro	Idade (mês)	Peso (Kg)	CE (cm)	Conc (x10 <sup>6</sup> /ml)	Tur (1-5)	Mot Pré (%)	DM (%)	Dm (%)	DT (%)	CAP (0-100)	Mot Pós (%)
D	23	450	30.1	660	4	70	9	5	14	100	45
G	23	420	34.2	150	5	70	8	5	13	100	30
L	25	412	35,2	690	5	70	8	5	13	100	60
H	22	400	30.1	310	4	70	15	6	21	85	30
C	25	410	31.0	280	4	70	8	10	18	84	50
J	26	430	32.5	162	5	70	9	2	11	84	30
M	24	460	31.0	195	4	70	9	2	11	84	30
B	23	440	31.0	295	3	60	11	8	19	77	30
F	26	400	31.5	410	5	60	9	6	15	76	30
A	25	440	30.5	312	3	60	14	2	16	61	50
E	21	350	28.8	460	4	60	11	10	21	61	30
I	22	380	29.0	141	4	60	15	3	18	61	45
$\bar{X}$ =12	<b>23,7</b>	<b>412</b>	<b>31,2</b>	<b>338,7</b>	<b>4,16</b>	<b>65,8</b>	<b>10,5</b>	<b>5,2</b>	<b>15,7</b>	<b>80,8</b>	<b>38,1</b>

CE: circunferência escrotal; Conc: concentração; Tur.: turbilhamento; Mot.: motilidade retilínea progressiva; Vig: vigor pré-pós congelação foram os mesmos igual a 5 para todos; DM: defeitos espermáticos maiores; Dm: defeitos espermáticos menores; DT: defeitos espermáticos totais, CAP: classificação andrológica por pontos; Mot Pós: motilidade retilínea progressiva após a criopreservação do sêmen;

Na TAB. 2 são apresentados os índices de congelabilidade de sêmen dos doze tourinhos Tabapuã selecionados a campo, aos dois anos de idade, com médias de motilidade pós-congelamento de 38,1 %. Houve efeito da criopreservação (p<0,01) para a motilidade, defeitos menores, do acrossoma e da cauda dobrada com perdas de 27,3 %, 5,23 %, 5 % e de 8,7 %, respectivamente. Os resultados observados para a queda da motilidade retilínea progressiva (Mot) são similares aos

relatados por Salvador (2005) e Rasul et al. (2001), com perdas de 31 % e 29 %, para sêmen de touros Nelore e Búfalos, respectivamente. Esses resultados podem ser explicados pela queda do metabolismo e alterações nas membranas mitocôndriais com o processo de criopreservação (Celeghini, 2005). Rasul et al. (2001) encontraram perda (p<0,05) do acrossoma de 11,4%, após congelamento do sêmen de touros Búfalos, enquanto neste trabalho foi verificada perda apenas de 5,0 %. Essa

diferença pode ser explicada pelo fato de que em bufalinos a taxa de recuperação dos espermatozoides pós-descongelamento serem diminuída comparada com a de bovinos, fato que pode ser explicado pelas diferenças de constituições das membranas espermáticas dos dois tipos de animais.

Salvador (2005), ao trabalhar com sêmen de touros Nelore e com o mesmo diluidor, encontrou integridade de acrossoma em sêmen pós-descongelamento de 85 %, enquanto neste estudo foi 94 %. Essa diferença pode ter sido atribuída à qualidade do sêmen usado nos dois trabalhos, já que no primeiro a Mot Pós foi menor (29,4 %) do que a observada neste estudo (TAB. 2). Rasul et al. (2001) reportaram que a perda de qualidade do acrossoma ocorria em função do extravasamento de seu conteúdo (acrosina e hialuronidase), esse fato foi também observado neste estudo, pois o principal tipo de defeito encontrado após

congelação foi o “capuchão”, adquirido, principalmente, pelas alterações nas membranas acrossomais, externa e interna, durante os processos de resfriamento e reaquecimento do sêmen, resultando no extravasamento de seu conteúdo, levando a esse defeito.

Ainda na TAB. 2 a diferença ( $p < 0,01$ ) encontrada pré-pós congelação nos defeitos de acrossoma e de cauda dobrada, estão de acordo aos reportados por Bailey e Buhr (1995) que relatam que as membranas da cauda e do acrossoma são as mais susceptíveis aos choques ocasionados pela criopreservação, em decorrência da menor proporção de colesterol e ácidos graxos saturados nessas porções da membrana plasmática espermática. As diferenças nas alterações da cauda espermática encontradas neste trabalho (9,2 %) são semelhantes às observadas por O’Connel et al. (2002) de 9,3 %.

Tabela 2. Efeito da criopreservação do sêmen sobre a motilidade e defeitos espermáticos em tourinhos Tabapuã com dois anos de idade, criados a pasto

Sêmen	Mot (%)	DM (%)	Dm (%)	Dacros (%)	Cdob (%)	DT (%)
Pré cong	65,4(a)	10,6(c)	5,38(d)	1,0(f)	0,5(h)	16,0 (j)
Pós cong	38,1(b)	11,5(c)	10,61(e)	6,0(g)	9,2(i)	22,1 (j)

Mot: motilidade espermática; DM: defeitos espermáticos maiores; Dm: defeitos espermáticos menores; Dacros: defeitos de acrossoma; Cdob: defeito espermático de cauda dobrada; DT: defeitos espermáticos totais; Médias acompanhadas por letras diferentes dentro da coluna diferem significativamente ( $p < 0,01$ ) pelo teste SNK, para variáveis paramétricas, e Mann-Whitney, para variáveis não paramétricas;

Os resultados do TTR1 estão apresentados na TAB. 3. Eles mostram que o sêmen se manteve com a mesma Mot Pós de 0 até 60 minutos de incubação a 38°C ( $p > 0,05$ ), a partir do qual, os espermatozoides começam a diminuí-la, porém mantendo-a semelhante até 4 horas de incubação ( $p < 0,05$ ). Sugere-se, nesse caso, que se deve proceder a técnica do TTR, para sêmen bovino criopreservado, até 90 minutos, porque a resposta será a mesma àquela de 4 horas de incubação ( $p > 0,05$ ) e diferente ( $p < 0,05$ ) de quando se iniciou o teste. Os resultados

observados neste estudo estão de acordo com os reportados por Parrish et al (1988), que relatam que o sêmen bovino criopreservado, perderia qualidade, a partir de 120 minutos de incubação. Com relação ao tempo para realização do TTR, Ferreira (2001) relatam que o tempo necessário seria de 120 minutos de incubação, para sêmen caprino criopreservado. Essa diferença encontrada (90 para 120 minutos) pode estar relacionada à espécie, pois o sêmen caprino possui menor taxa de recuperação e período

de sobrevivência pós-descongelamento, e à pressão de seleção para congelabilidade do

sêmen dos touros trabalhados neste estudo.

Tabela 3. Teste de termorresistência lento (TTRI/38°C por 4hs) efetuado no sêmen criopreservado de doze tourinhos Tabapuã pré-selecionados pelo CAP aos dois anos de idade, de acordo com o tempo

Tempo (min)	Mot Pós (%)						
0	38,1(a)	60	30,6(a,b)	135	20,3(b)	195	15,3(b)
15	36,2(a)	90	26,8(b)	150	18,7(b)	210	14,9(b)
30	33,7(a)	105	22(b)	165	17,8(b)	225	14,4(b)
45	32,5(a)	120	19,5(b)	180	17,18(b)	240	13,3(b)

Mot Pós: motilidade progressiva retilínea pós-criopreservação; letras diferentes na coluna diferem ao nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis;

Os resultados da comparação dos defeitos espermáticos logo após o descongelamento e daqueles observados nos finais dos TTRr e TTRI, estão mostrados na TAB. 4. Os resultados indicam que o tempo de incubação não influenciou ( $p>0,05$ ) na taxa de defeitos menores, nos defeitos totais e nos de cauda dobrada. Entretanto as taxas de defeitos maiores, de acrossoma e a Mot foram maiores ( $p<0,05$ ) nos TTRr e TTRI em relação a seus valores pós-descongelamento, porém os valores referentes aos TTRr e TTRI ( $p>0,05$ ) foram semelhantes. Esses resultados sugerem que estas variáveis seriam as responsáveis pela reduzida fertilidade em sêmen criopreservado. Os resultados dos TTRr e

TTRI foram semelhantes, tanto para a motilidade como para morfologia espermática, o que sugere que se pode utilizar o TTRr em detrimento do TTRI, em decorrência da menor demanda de tempo, do primeiro teste. Esses resultados estão de acordo com Arruda (1988).

Nesse experimento a perda da integridade acrossômica foi de 4,8 % pela leitura no contraste de fase. Salvador (2005) encontrou uma perda de 9 %, em tourinhos da raça Nelore. Essa diferença pode ser explicada pela menor motilidade do sêmen da amostra utilizada pelo autor (29,3%), e pela pressão de seleção para qualidade do sêmen ter sido mais acentuada nos tourinhos do presente experimento.

Tabela 4 – Defeitos espermáticos e motilidade retilínea progressiva observados imediatamente pós criopreservação do sêmen, pós TTRr e pós TTRI em tourinhos da raça Tabapuã, de dois anos de idade criados a pasto

Variáveis	Pós Desc	TTRr	TTRI
Mot	38,1(a)	16,7(b)	10,1(b)
Dacros	6,0 (a)	10,8 (b)	9,8 (b)
Cdob	8,7 (c)	5,8 (c)	11,3 (c)
DM	11,12 (d)	16,9 (e)	16,0 (e)
Dm	9,8 (f)	6,1 (f)	12,0 (f)
DT	20,9 (g)	23,0 (g)	28,0 (g)

Médias acompanhadas por letras diferentes nas linhas diferem ( $p<0,05$ ) pelo teste de SNK, para variáveis paramétricas, e Kruskal-Wallis, para variáveis não paramétricas. Mot: motilidade retilínea progressiva; Dacros: defeitos de acrossoma; Cdob: cauda dobrada; DM: defeitos espermáticos maiores; Dm: defeitos espermáticos menores; DT: defeitos espermáticos totais; Pós Desc: imediatamente pós descongelamento; TTRr: teste de termoresistência rápido; TTRI: teste de termoresistência lento.

Na TAB. 5 os tourinhos foram divididos em dois grupos um com motilidade maior que 40 % e o outro com motilidade menor que 40 %. Para os testes de RAI 2, RAI 3, e IP, não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os grupos. Isto mostra que essas variáveis independem da Mot Pós, desde que ela atinja o nível mínimo de 30 % (CBRA, 1998), como foi observada nesse estudo. Esse fato era de se esperar já que o RAI 2 e RAI 3 avaliam a integridade e funcionalidade (capacidade dos espermatozoides de reagir o acrossoma pela heparina em condições “in vitro”) das membranas acrossomais, e não das membranas mitocondriais, localizadas nas caudas dos espermatozoides, portanto, independem da Mot Pós. A diferença observada ( $p<0,05$ ) para o Thos, e ambos TTR (rápido e lento), mostram que essas variáveis dependem da Mot Pós. Esse fato pode ser justificado pela interpretação do Thos indicar funcionalidade da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides, onde estão localizadas as mitocôndrias

responsáveis pela energia requerida para o batimento flagelar (ATP), explicando a relação com a Mot Pós (Jeyendran et al. 1984).

A média encontrada nesse experimento para o teste Thos foi 24,7 %, resultado semelhante ao observado por Correa e Zavos (1995), e Brito et al. (2003) que encontraram médias 30 % e 28 %, respectivamente. Entretanto, Jeyendran et al. (1984), Correa et al. (1997), Rota et al. (1999) encontraram médias 36,8 %, 44,4 % e 43,8 %, respectivamente. Essas diferenças podem ser atribuídas às raças, espécies e aos diluidores diferentes, já que estes fatores podem interferir na qualidade do sêmen criopreservado. Esses resultados sugerem que a integridade funcional da membrana da cauda do espermatozoide e a resistência metabólica são fatores que se somam e refletem seus efeitos na motilidade espermática percentual, e na integridade das membranas mitocondriais, resultando em queda na Mot Pós.

Tabela 5 - Grupos com Mot Pós superior e inferior a 40 %, em relação aos testes funcionais e IP, em sêmen criopreservado de tourinhos Tabapuã com dois anos de idade, criados a pasto

Grupos (%)	TTRr	TTRI	RAI 2	RAI 3	Thos	IP	Mot Pós
Mot Pós<40	2,6 (b)	5,7 (c)	19,1 (e)	20,1 (f)	18,8 (g)	50,0 (i)	30,0 (j)
Mot Pós>40	21,0 (a)	30,0 (d)	10,7 (e)	27,8 (f)	28,1 (h)	42,5 (i)	50,0 (l)

Letras diferentes dentro da coluna indicam diferenças ( $p<0,05$ ) entre as médias pelo teste SNK, para variáveis paramétricas, e Mann-Whitney, para variáveis não paramétricas (TTRr, TTRI e Mot Pós). Mot Pós: motilidade retilínea progressiva pós descongelamento; TTRr: teste de termorresistência rápida; TTRI: teste de termorresistência lento; RAI 2 : reação acrossômica induzida pela heparina; RAI 3 : reação acrossômica induzida pelo LPC (lisofosfatidilcolina); Thos - teste hiposmótico; IP: índice de prenhez na primeira inseminação artificial;

Na TAB. 6 são apresentados os resultados sobre o efeito da heparina e do LPC sobre a porcentagem de espermatozoides vivos após 04h15min de incubação e sobre a indução da reação acrossômica. A média da RAI 3 foi 22,7 %. A RAI 2 foi capaz de induzir a reação em 15,9 % dos espermatozoides viáveis que se diferiu ( $p<0,05$ ) daquela

observada em relação ao tratamento controle (RAI 1), 4,33 %. Não foi observada diferença ( $p>0,05$ ) de indução entre a heparina (RAI 2) e da heparina + LPC (RAI 3). Também não foi observado efeito ( $p>0,05$ ) na taxa de espermatozoides vivos para a heparina e o LPC quando comparados ao controle (RAI 1). Não foi também

observada queda na porcentagem de vivos, com o tempo de incubação e com o Talp, pós-descongelamento, quando comparados o RAI 1 e o RAI 0.

A média de RAI observada nesse estudo (22,7 %) foi semelhante às observadas por Parrish et al. (1985), Blottner et al. (1990), Feliciano Silva (1998), Salvador (2005), que encontraram médias de 29,0; 24,1; 24,0 e 18,0 %, respectivamente. O resultado de indução da RAI pela heparina no presente estudo foi de 15,9 %, que corrobora os resultados encontrados por Januskauskas et al. (2000) e Pereira et al. (2000) de 10 % e 16,5 %, respectivamente. A não diferença observada ( $p>0,05$ ) nesse trabalho da indução pelo RAI 2 e RAI 3, foi contrária ao resultado observado por Parrish et al. (1988), entretanto estes autores utilizaram sêmen a fresco, ao contrário do sêmen criopreservado usado nesse estudo. Isso pode ser explicado pelo efeito deletério da criopreservação, que resultou em menor quantidade de células vivas, ao final do experimento, levando à distorção na interpretação dos resultados. Outro fato que deve ser considerado são os efeitos semelhantes à capacitação ocasionadas pelo processo de criopreservação, potencializando o efeito capacitante da heparina, levando a indução da reação acrossômica, em função da maior fluidez das membranas acrossomais e maior concentração de cálcio intracelular em

células pós-congelação, explicando a não diferença ( $p>0,05$ ) encontrada pelos RAI 2 e RAI 3, mascarando o efeito do LPC (componente fusogênico) sobre a reação acrossômica (Lukoseviciute et al., 2005), não necessitando de ser utilizado em sêmen criopreservado.

A taxa de espermatozoides viáveis não diferiu ( $p>0,05$ ) entre os grupos, isto também foi observado por Parrish et al. (1988), ao contrário das observações de Januskauskas et al. (2000) e Lukoseviciute et al. (2005). Não houve efeito da incubação e nem da heparina sobre o percentual de células vivas. Isto esclarece a dúvida sobre o tempo de incubação com a heparina, que para sêmen criopreservado, pode ser de 04h15min. Pois segundo Januskauskas et al. (2000), o congelamento reduz a viabilidade e longevidade espermática, este ao se somar com a heparina, em razão do seu efeito capacitante, conduziria a célula espermática a um período reduzido de sobrevivência, trazendo prejuízo na interpretação dos resultados. Porém nesse experimento, talvez pela alta qualidade inicial das amostras, resultando em alta taxa de recuperação pós-congelação, houve sobreposição aos efeitos deletérios da heparina e do LPC, não sendo observado efeitos dos mesmos sobre o percentual de células vivas após as 4: 15 h de incubação, avaliadas pelo corante azul de tripan.

Tabela 6 – Reação acrossômica induzida e taxa de espermatozoides vivos, em sêmen criopreservado e incubados por 4: 15 horas, em tourinhos Tabapuã com dois anos de idade, criados a pasto, de acordo com os tratamentos

Característica (%)	RAI 1	RAI 2	RAI 3
RAI	4,3a	15,9b	22,7b
Espermatozoides vivos	21,0a	23,7a	17,6a

RAI: reação acrossômica induzida; RAI 1: sêmen incubado 4:15 hs com solução tampão (talp hepes); RAI 2 - sêmen incubado 4:15 hs com solução tampão Talp hepes e heparina; RAI 3 - sêmen incubado 4:15 hs com solução tampão (talp hepes), heparina e LPC; % vivos – é a porcentagem de espermatozoides vivos indicados pelo azul de tripan; médias acompanhadas por letras diferentes entre as linhas indicam diferenças significativas ( $p<0,05$ ), pelo teste SNK;

Na TAB. 7 são apresentados os resultados do sêmen criopreservado de tourinhos Tabapuã com dois anos de idade, que foram usados na IA, com obtenção do IP: 50 %, nas novilhas Nelore, cuja variação individual foi de 25 % a 100 %, por tourinho usado no experimento. Foram formados dois grupos de IP (> ou < do que 50 %), de acordo com Correa et al (1997), comparando-os com parâmetros de avaliação de sêmen pós-descongelamento e os testes funcionais realizados. Como pode ser verificado, não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre as variáveis estudadas nos dois grupos de touros quanto ao IP, uma vez que foram preservados os valores mínimos preconizados pelo CBRA (1998) para sêmen criopreservado, para se obter índices satisfatórios de prenhez, como obtido nesse experimento.

Os resultados observados neste experimento, não estão de acordo com os encontrados por Correa et al. (1997), que observaram diferenças ( $p<0,05$ ) para Mot Pós, morfologia espermática, integridade de acrossoma e do Thos, em relação a grupos de alta e de baixa fertilidade. Esses valores também contrastam com os reportados por Feliciano Silva (1998) que encontrou diferença ( $p<0,05$ ) entre a RAI de grupos com superior (IP= 84 %) e inferior (IP= 65 %) fertilidade, 14 e 34 %, respectivamente, porém estão de acordo com os obtidos por Assumpção et al., 2002. Talvez o fato de se ter usado sêmen criopreservado, somente na primeira IA, em novilhas com o cio sincronizado, e o tamanho da amostra utilizada, nesse estudo, possa explicar o resultado contrastante observado neste experimento em relação aos autores que utilizaram mais de uma IA por matriz, sêmen a fresco, e fêmeas não sincronizadas.

Tabela. 7- Testes funcionais em grupos de sêmen criopreservado IP > ou < que 50 % em tourinhos Tabapuã, com dois anos de idade, criados a pasto

Grupos	Thos	Mot Pós	RAI	Pós descongelamento		Pós TTR rápido (38 °C/4h)		Pós TTR lento (45°C/30')	
				DM	DT	DM	DT	DM	DT
IP>50%(67,5a)	22,8 (a)	37,14 (a)	21,8 (a)	9,8 (a)	20,4 (a)	18,2 (a)	22,6 (a)	17,8 (a)	31,4 (a)
IP<50%(20,0b)	19,2 (a)	37,0 (a)	27,6 (a)	12,4 (a)	21,4 (a)	15,6 (a)	23,4 (a)	14,2 (a)	24,6 (a)

Thos: teste hiposmótico; Mot Pós: motilidade imediatamente pós descongelamento; Pós TTRr: teste de termorresistência rápido; Pós TTRI: teste de termorresistência lento; DM: defeitos espermáticos maiores; DT: defeitos espermáticos totais; \*IP com variação individual por touro de 25 % a 100 % , em novilhas sincronizadas (PGF2 $\alpha$ ); Médias acompanhadas por letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente ( $p<0,05$ ), pelo teste SNK, para variáveis paramétricas, e Mann-Whitney, para variáveis não paramétricas.

A FIG. 1 é apresentada os resultados obtidos quanto dos testes funcionais e a comparação entre os mesmos. O Thos (24,7 %), a TxvivRAI 3, a Taxviv 0 (24,3 %), e ao RAI 3 (22,7 %) não apresentou diferenças ( $p>0,05$ ). Dessa forma, por qualquer método de avaliação da integridade da membrana, pode se determinar a viabilidade da mesma, uma vez que, havendo alterações em sua estrutura, sua funcionalidade e capacidade

de haver reação acrossômica são também comprometidas.

Não houve diferença entre os resultados observados para a Txviv 0 e TxvivRAI 3 ( $p>0,05$ ). Este resultado é semelhante ao observado por Lukoseviciute et al. (2005), que utilizaram as mesmas técnicas e tempo de incubação. O RAI 3, a Txviv 0 e a TxvivRAI 3, também não apresentaram

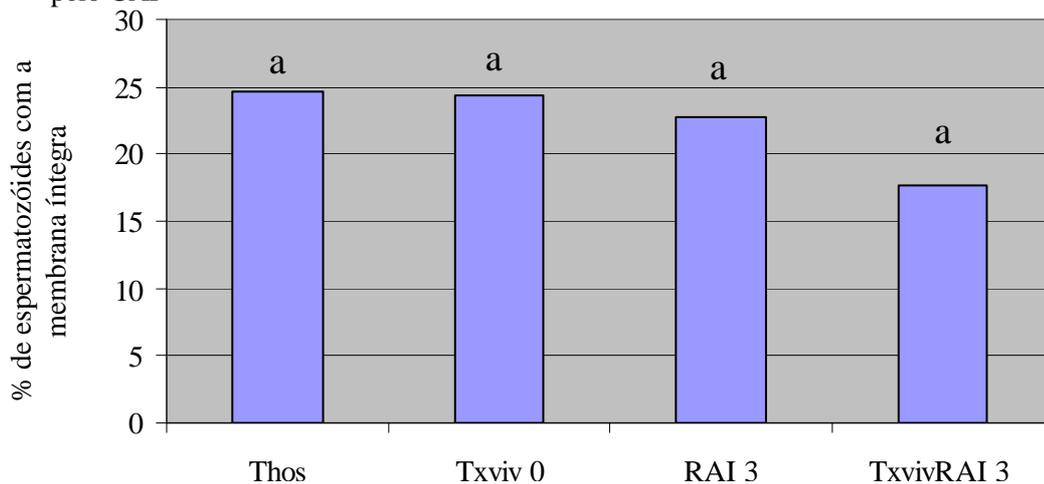
diferenças ( $p>0,05$ ), fato também encontrado por Parrish et al. (1985).

Não foram encontradas diferenças ( $p>0,05$ ) no Thos entre as seguintes osmolaridade: 75, 100 e 125 (mOsmol/ml). Porém houve variabilidade de resposta entre touros ( $p<0,05$ ) com relação ao Thos, semelhante ao reportado por Rota et al. (1999), embora não observado por Correa et al. (1997). Não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os resultados do Thos e da coloração espermática pelo azul de tripan, nesse experimento. Resultados semelhantes foram encontrados por Tartaglione e Ritta (2004), porém diferente do encontrado por, Schrader et al. (1986), Vazquez et al. (1996) e Brito et al. (2003), ( $p<0,05$ ). Essas divergências ocorreram pelo fato de Schrader et al. (1986) e Vazquez et al. (1996) terem trabalhado com sêmen de humanos e de suínos a fresco, respectivamente, pois como tais espécies possuem menor taxa de recuperação pós congelamento comparados com os bovinos, tal fato pode interferir na interpretação dos resultados. Brito et al. (2003) trabalharam

com amostras de sêmen congeladas de touros das raças *Bos taurus taurus* (Hereford, Simental, Charolês e Limousin), de 2 a 7 anos de idade. No presente experimento utilizou-se sêmen criopreservado de tourinhos *Bos taurus indicus* (Tabapuã) aos dois anos de idade. Deve-se ressaltar também a diferença entre os diluidores e métodos de criopreservação utilizados.

A pressão de seleção para qualidade do sêmen também poderia ser um dos fatores que contribuíram para a obtenção de resultados contrastantes. Tais resultados sugerem que apesar dos testes avaliarem diferentes aspectos da membrana plasmática espermática, integridade funcional (Thos) e integridade estrutural (coloração vital pelo azul de trypan) e capacidade das membranas acrossomais passarem pela reação acrossômica induzida pela heparina (RAI 3), o resultado de um pode ser utilizado como preditor do outro, em sêmen de touros Tabapuã, aos dois anos de idade, criados a pasto e selecionados pelo CAP.

Figura 1 - Comparação entre os testes que avaliam a integridade das membranas espermáticas em sêmen criopreservado de tourinhos Tabapuã aos dois anos de idade, selecionados pelo CAP



Thos: teste hiposmótico; Txviv 0: % spz vivos pelo método azul de tripan logo após o descongelamento das amostras de sêmen; RAI 3: % de spz vivos com acrossoma reagido logo após o tratamento com sêmen+Talp-hepes+heparina+LPC; TxvivRAI 3: % spz vivos pelo método azul de tripan após tratamento com sêmen+Talp-hepes+heparina+LPC; letras iguais indicam que não há diferença entre as médias ao nível de significância de 5% pelo Teste SNK.

Na TAB. 8 estão apresentadas as correlações de Pearson entre as variáveis espermáticas pré-pós-congelamento do sêmen e os aspectos clínico-andrológicos, que se apresentaram com altas magnitude ( $p < 0,05$ ) em relação aos testes funcionais, processados nos mesmos, e o IP. Nesse experimento nenhuma correlação foi observada entre a RAI e o IP, este mesmo fato foi observado por Januskauskas et al. (2000) e por Assumpção et al. (2002). Entretanto Ax e Lenz (1984; 1987), Lenz e Bellin (1987), Blotner et al. (1990), Whitfield e Parkinson (1992) e Feliciano Silva (1998) encontraram correlações significativas ( $p < 0,05$ ) e de alta magnitude entre estes testes. Deve ser ressaltado que esses autores utilizaram taxas de não retorno aos 56 (ou 90) dias, enquanto no presente trabalho utilizou-se o IP, confirmada pela palpção retal após 60 dias da IA, já que a correlação entre essas variáveis (IP e taxa de não retorno) tem sido reportada como baixa (Phillips et al., 2004).

No presente estudo, a correlação entre a RAI e a Mot Pré foi significativa ( $p < 0,05$ ) e alta ( $r = 0,72$ ). O mesmo foi encontrado por Whitfield e Parkinson (1992). Esse resultado é explicado pelo fato da correlação entre Mot Pré e a Mot Pós ser alta (0,88), e da última ter também alta correlação com a TxvivRAI 3 (0,88), já que o RAI 3 é dependente da porcentagem de espermatozoides vivos após a incubação de 4:15 horas. A RAI ainda teve alta correlação negativa ( $r = -0,90$ ) com DTr, DMr ( $r = -0,80$ ), e com Dacros pré-congelamento ( $r = -0,62$ ). Esses resultados são esperados pelo fato de que células com acrossomas lesados não reagem à heparina, em razão da não ligação da mesma aos sítios de fixação contidos na membrana acrossomal externa (Januskauskas et al., 2000); ou pela perda do mesmo, antes da reação com a heparina e ou com suas proteínas ligadoras de heparina.

Tanto no TTRr quanto no TTRI, foram observadas altas correlações entre si ( $r = 0,96$ ), bem como com a Mot Pós ( $r = 0,89$  e

$r = 0,88$ ), com o teste hiposmótico ( $r = 0,69$  e  $r = 0,78$ ) e TxvivRAI 3 ( $r = 0,72$  e  $0,83$ ). Resultados semelhantes foram também encontrados por Ferreira (2001) que observou altas correlações entre TTRr e Mot Pós, porém não encontrou com a Mot Pré, da mesma forma que nesse estudo. Não foi também observada correlação entre Mot Pós e IP, ao contrário das observações de Christensen et al. (2005). Porém nesse experimento, somente, foram utilizadas amostras com taxas de recuperação satisfatórias pós-descongelamento, sendo realizadas alta pressão de seleção para congelabilidade das mesmas. Esses resultados confirmam àqueles encontrados na TAB. 5, onde foi observado que os TTRr, TTRI e o Thos variaram em função dos grupos de Mot Pós, verificando relação entre os mesmos.

Alta correlação foi encontrada entre o Thos e Mot Pós ( $r = 0,76$ ), o que não foi observado para Mot Pré, nesse estudo. Fato também observado por Jeyendran et al. (1984) e Ferreira (2001). No presente estudo encontrou-se altas correlações entre Thos e Txviv 0 e TxvivRAI 3 ( $r = 0,70$  e  $r = 0,73$ ), o mesmo observado por Tartaglione e Ritta (2004), embora, Jeyendran et al. (1984) e Brito et al. (2003) tenham encontrado médias correlações entre essas características. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que a integridade funcional da membrana plasmática, avaliada pelo Thos, seja um preditor da integridade estrutural da mesma em sêmen criopreservado, avaliada pelo azul de tripan, com satisfatória taxa de recuperação pós descongelamento, de tourinhos Tabapuã aos dois anos de idade.

Nesse trabalho não foi encontrada também correlação entre Thos e IP, à semelhança dos resultados observados por Rota et al. (1999), Brito et al. (2003) e Tartaglione e Ritta (2004). Entretanto Jeyendran et al. (1984) e Correa et al. (1997) encontraram altas e médias correlações ( $r = 0,90$  e  $0,57$ ). Essas

Tab. 8 – Correlações de Pearson entre os principais parâmetros espermáticos avaliados<sup>1</sup>

	Tur	Mot pré	DTpré	Txviv 0	Txviv RAI 3	TTRI	TTRr	Dmr	Dtr	CE	Dacrospré	Dmr	Dmpós	Mot Pós
Tur					-0,66			-0,78		0,64				0,86
Mot Pré										0,71			0,69	0,88
DMpré	-0,85	-0,72						0,76		-0,68				
DTpré		-0,84								-0,64				
CAP	0,65	0,82	-0,67							0,92				
Dmpré	0,65		0,83							-0,68				
Txviv 0					0,69									
TxvivRAI 3	-0,66			0,69		0,83	0,72	0,79					0,67	0,80
TTRI					0,83									0,88
TTRr					0,72	0,96								0,89
Dmr	-0,78				0,79									0,86
DTr												0,82		
DMI			0,79									-0,84		
Dml	-0,78				0,69								0,67	
DTI	-0,87							0,81						
RAI 3		0,72							-0,90		-0,62	-0,80		
Thos				0,70	0,73	0,78	0,69							0,76

<sup>1</sup>Somente estão representados correlações estatisticamente significativa (p<0,05); Tur: turbilhamento dos espermatozoides pós-ejaculação; Mot Pré: motilidade espermática pré congelação; DMpré: defeitos espermáticos maiores pré congelação; DTpré: defeitos espermáticos totais pré-congelação; CAP: classificação andrológica por pontos; Dmpré: defeitos espermáticos menores pré congelação; Txviv 0: taxa de espermatozoides vivos logo após a descongelação do sêmen, pelo azul de tripan; TxvivRAI 3: taxa de espermatozoides vivos após 4:15 h de incubação do sêmen com heparina e LPC (Lisofosfatidilcolina); Dmr: defeitos espermáticos menores após o TTRr; DTr: defeitos espermáticos totais após o TTRr; DMI: defeitos espermáticos maiores após o TTRI; Dml: defeitos espermáticos menores após o TTRI; DTI: defeitos espermáticos totais após o TTRI; RAI 3: taxa de reação acrossômica induzida pela heparina e LPC após 4:15 h de incubação; Thos: teste hiposmótico; IP: índice de prenhez confirmada por palpação retal aos 60 dias após a IA; CE: circunferência escrotal; Dacrospré: defeitos de acrossoma pré congelação; Dmpós: defeitos espermáticos menores pós descongelamento do sêmen; Mot Pós: motilidade espermática pós descongelamento do sêmen;

diferenças podem ser explicadas pelas diferentes espécies trabalhadas (touro/homem), pelo método de congelamento (curva de resfriamento, tipo de diluidor, método de descongelamento), pela IA somente ao primeiro cio, pela utilização de fêmeas sincronizadas e pelo número de novilhas utilizadas.

As correlações observadas entre CE e Tur, Mot pré, DMpré, Dmpré, DTpré, e CAP foram de altas magnitudes, e iguais a 0,64, 0,71, -0,68, -0,68, -0,64 e 0,92, respectivamente. Esses resultados foram similares aos encontrados por Salvador (2001), 0,71 (entre CE e CAP), embora, Dias (2004), tenha encontrado correlação de 0,36. Essas diferenças, referentes ao CAP, podem ser atribuídas às idades dos animais trabalhados, e/ou ao nível de padronização andrológica dos mesmos. Isto evidencia a importância da avaliação e seleção precoce dos tourinhos, para serem usados como reprodutores. As correlações entre CE, CAP e os aspectos morfológicos do sêmen (defeitos totais) foram de -0,64 e -0,67. Dias (2004) encontrou  $r = -0,15$  e  $r = -0,65$ , para as mesmas características, respectivamente. Enquanto Salvador não encontrou qualquer correlação ( $p > 0,05$ ). Esses resultados encontrados nesse estudo sugerem que a CAP é um bom método para seleção de animais Tabapuã, aos dois anos de idade, para boa qualidade de sêmen, em monta a campo, semelhante ao reportado por Dias (2004).

Observa-se ainda, com base na tabela 8, que

nenhuma característica analisada separadamente obteve correlação ( $p > 0,05$ ) com IP. O mesmo foi encontrado por Zhang et al. (1999) e Brito et al. (2003). Entretanto quando as análises são feitas em conjunto, através de uma análise de regressão múltipla, observa-se que o coeficiente de determinação aumenta progressivamente, à medida que, acrescenta-se mais característica avaliada. A inclusão de todas as variáveis explicativas ao modelo, porém, não explicou significativamente variações no IP, apesar de o modelo apresentar coeficiente de determinação  $R^2 = 0,83$  (ver Tab 9), mostrando que apesar dos testes funcionais não diferirem ( $p > 0,05$ ), na comparação entre seus valores (ver FIG. 1), cada um tem sua parcela de contribuição para se prever o IP. O mesmo foi previamente reportado por Zhang et al. (1999) e Kirk et al. (2005), melhorando assim, a capacidade preditiva das análises espermiáticas laboratoriais, em relação ao IP.

Dessa forma, pode-se ver a complexidade dos eventos ligados à fertilidade, bem como, a complexidade da célula espermiática, envolvendo diferentes fatores, explicando, assim, o fato de que apesar do  $R^2$  alto (0,83), o mesmo não ter sido significativo. Isto mostra que podem existir alguns fatores envolvidos que não foram controlados no presente estudo. Talvez se utilizasse maior número de fêmeas nesse experimento, o  $R^2$  pudesse ter sido significativo, pois permitiria avaliar com melhor precisão o efeito das variáveis, diminuindo assim o “erro” experimental.

Tabela 9 – Resultado das análises de regressão utilizando o TTRr, o Thos, a RAI 3, a Mot Pós, o DMpré e o DTpré, avaliados separadamente ou em conjunto para prever a taxa de prenhez a campo

Variável	Coefficiente de determinação
TTRr.	0,15
TTRr+Thos	0,16
TTRr+Thos+RAI 3	0,44
TTRr+Thos+RAI 3+Mot Pós	0,52
TTRr+Thos+RAI 3+Mot Pós+DMpré	0,52
TTRr+Thos+RAI 3+Mot Pós+DMpré+DTpré*	0,83*

\* FERT = 148,83- 0,178TTRr + 3,406Thos + 4,187RAI - 6,541Motpós - 16,508DM +7,761DTOT (R<sup>2</sup> = 0,83).

## 5 – CONCLUSÕES

A criopreservação do sêmen bovino altera a taxa de anormalidades espermáticas do acrossoma, bem como de caudas dobradas nos espermatozoides. Sobretudo a longevidade dos gametas com relação aos defeitos de acrossoma após o TTRr e o TTRI.

O teste hiposmótico (Thos) é de baixo custo e de fácil exequibilidade, podendo ser um teste para coadjuvar, caso necessário, a acurácia do sistema de avaliação de sêmen bovino criopreservado, não só para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática, mas também a integridade estrutural da mesma, e capacidade das membranas acrossomais passar pela reação acrossômica induzida pela heparina.

Nenhum teste utilizado nesse experimento (separadamente ou em conjunto) foi capaz de prever o IP, utilizando-se sêmen criopreservado de tourinhos Tabapuã aos dois anos de idade selecionados pela CAP.

Utilizando-se as normas técnicas recomendadas pelo CBRA (1998), para sêmen bovino criopreservado, pode-se alcançar índices de prenhez satisfatórios, sem haver a necessidade de uso dos testes funcionais testados nesse experimento.

A heparina foi capaz de induzir a reação acrossômica espermática sem alterar o número de células vivas, durante o período de incubação de 4h 15 min, podendo ser utilizada durante este período, sem acarretar prejuízo na interpretação dos resultados.

Em sêmen criopreservado não há necessidade de se utilizar o LPC para indução da reação acrossômica, quando se usa a heparina.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; et al. Membrane Structure. In: \_\_. *Molecular biology of the cell*. 3 ed., Local: Garland Publishing, New York. 1994. Cap. 10, p. 478-506.

ARRUDA, R. P. *Avaliação do sêmen congelado de bovinos*. Prova lenta e rápida de termorresistência: efeitos sobre a fertilidade. 1988. 41f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

ASSUMPÇÃO, M.E.O.D.A.; HAIPECK, K.; LIMA, A.S.D. et al. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 39, n. 3, p. 149-156, 2002.

- AX, R.L.; LENZ, R.W. Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. *J. Dairy Sci.*, v.70, n. 7, p.1477-1486, 1987.
- BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. Regulation of internal Ca<sup>2+</sup> by chilled bull and boar spermatozoa. *Cryobiology*, v. 32, n. 3, p. 259-269, 1995.
- BALL, B. A.; BAUMBER, J.; SABEUR, K. Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 58, n. 2, p. 299-300, 2002.
- BAZER, F. W.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T. Fertilization, Cleavage and Implantation. In: HAFEZ, E.S.E. *Reproduction in farm animals*. 6<sup>a</sup> ed., Philadelphia: Manole, 1995. v. 6, cap. 8, p. 188-193.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Veterinary Medicine*, v. 25, n.7, p. 383- 391, 1973.
- BLOTTNER, S.; NEHRING, H.; TORNER, H.A. Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin in vitro: relationship to fertility. *Theriogenology*, v. 34, n. 3, p.619-628, 1990.
- BREITBART, H.; SPUNGIN, B. The biochemistry of the acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction*, v. 3, n. 3, p. 195-202, 1997.
- BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU-GOESEELS, S. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*, v. 60, n. 8, p. 1539-1551, 2003.
- CELEGHINI, E. C. C. *Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes*. 2005. 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CHRISTENSEN, P.; BROCKHOFF, P.B.; LENH-JENSEN, H. The relationship between sêmen quality and the nonreturn rate of bulls. *Reproduction Domestic Animals*, v. 34, n. 6, p. 503-507, 1999.
- CORREA, J.R.; PACE, M.M., ZAVOS, P.M. Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, v. 48, n. 5, p. 721-731, 1997.
- DA SILVA, L. O. L., NIETO, L. M., ROSA, A. N. Programas de identificação e utilização de animais geneticamente superiores. In: \_\_Simpósio de Produção e Gado de Corte, n. 5, 2006, Viçosa-MG. *Anais...* Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006, p. 220-238.
- DIAS, J. C. *Aspectos andrológicos, biometria testicular e parâmetros genéticos de características reprodutivas de touros nelore, de dois e três anos de idade, criados extensivamente no Mato Grosso do sul*. 2004. 52 f. Dissertação (Mestrado em zootecnia). Escola de Veterinária da UFMG, Belo horizonte.
- DE SOTO, M. A. B. *Caracterização de Proteínas do Sêmen congelado de Touros da Raça Nelore e suas relações com taxa de prenhez*, 2005. 54 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal). Escola de Veterinária da UFMG, Belo horizonte.
- FELICIANO SILVA, A. E. D. *Reação acrossômica induzida: método indicador de*

- fertilidade de touros*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 38p., (Embrapa Recursos Genéticos, Documentos, 35).
- FERREIRA, A. D.S. *Características reprodutivas e congelamento do sêmen de reprodutores das raças Alpina e Saanen submetidos ao manejo do fotoperíodo*. 2001. 51 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 114, n. 3, p. 197-235, 2000.
- FLORMAN, H.M.; FIRST, N.L. The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Dev. Biol.*, v.128, n. 2, p.453-463, 1988.
- FRENEAU, G.E.; VALE FILHO, V.R.; MARQUES, J.R., et al. Puberdade em touros Nelore criados a pasto, no Brasil: Características corporais, testiculares, seminais e de índice de capacidade andrológica por pontos (ICAP). *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 58, n. 6, p. 1107-1115, 2006.
- GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M.; et al. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*. V. 68, n. 4, p. 249-265, 2001.
- GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A. OLIVEIRA, M. A. de, et al. Produção in vitro de embriões. In: *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo: Varela, 2002. v. 1, cap. 10, p.195-225.
- GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrossomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, v. 43, n. 1, p. 55-64, 1990.
- HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. *J. R. Microsc. Soc.*, v. 76, p.84-97, 1957.
- HANDROW, R.R.; BOEHM, S.K.; LENZ, R.W. et al. Specific binding of the glycosaminoglycan <sup>3</sup>H-heparin to bull, monkey, and rabbit spermatozoa in vitro. *J. Androl.*, v.5, n. 1, p.51-63, 1984.
- JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L. et al. Relationship between sperm response to glycosaminoglycans in vitro and non-return rates of Swedish dairy AI bulls. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 35, n. 5, p. 207-212, 2000.
- JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H., PEREZ-PELAEZ, M., et al. Development of an assay to assess the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.*, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.
- JONDET, R. *Contribution à l'amélioration de la technologie du sperme de taureau*. 1980. 165f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Universidade Rennes, França.
- JUHÁSZ, J.; NAGY, P.; KULCSÁR, M.; HUSZENICZA, G.Y. Methods for semen and endocrinological evaluation of stallion: A Review. *Acta Vet. Brno*, v.69, n. 4, p. 247-259, 2000.
- KILLIAN, G. J. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Animal Reproduction Science*, v. 83, n. 1, p. 141-153, 2004.
- KIRK, E.S.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved

- stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 64, n.6, p. 1422-1439, 2005.
- LAMIRANDE, E. D.; LECLERC, P.; GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. V. 3, n. 3, p. 175- 194, 1997.
- LEE, C.N.; HANDROW, R.R.; LENZ, R.W. et al. Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reaction in bovine spermatozoa in vitro. *Gamete Res.*, v.12, p.345-355, 1985.
- LENZ, R.W.; MARTIN, J.; BELLIN, M.E.; et al. Predicting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reactions in sperm with chondroitin sulfates. *J. Dairy Sci.*, v. 71, n. 4, p. 1073-1077, 1987.
- LUKOSEVICIUTE, K.; ZILINSKAS, H.; JANUSKAUSKAS, A. A The effect of oestradiol, progesterone and heparin on bovine spermatozoa function after thawing. *Reproduction Domestic Animals*, v. 40, n.2, p. 100-107, 2005.
- LUDWICK, T.M., OLDS, D., CARPENTER, M. A method of evaluating bull semen. *Journal Dairy Science*, v.31, n. 8, p. 677, 1948.
- MANUAL para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ª ed Belo Horizonte: CBRA, 1998. 53 f.
- MELO, M.I.V.DE. *Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino*. 1999. 67f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MEMARI NETO, A.C.E. Gestão de sistemas de produção de bovinos de corte: índices zootécnicos e econômicos como critérios para tomada de decisão In: *Simpósio de Produção de Gado de Corte*, n.5, 2006, Viçosa-MG. *Anais...Viçosa: Universidade Federal de Viçosa*, 2006, p. 30-46.
- MILLER, D.J.; MARTIN, A.W.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology of Reproduction*, v.42, n. 6, p.899-915, 1990.
- MOORE, H. D. M.; BEDFORD, G. M. The Interaction of Mammalian Gametas in the Female. In: HARTMANN, J. F. *Mecanism and control of Animal Fertilization*. New York: Academic Press, 1983. v.1, cap. 10, p. 453-472.
- O'CONNEL, M.; McCURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, v. 17, n. 3, p. 704-709, 2002.
- OHASHI, O. M. Inseminação artificial em bubalinos. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 1ª. São Paulo: Varela, 2002.v.1, cap.6, p. 97-110.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, n. 2, p. 209-222, 1992.
- PARKS, J.E. Hypothermia and Mammalian gametes, In: KAROW, A.M.; CRITSER, J.K. (Ed.) *Reproduction Tissue Banking: Scientific Principles*. Local: San Diego, Academic Press, 1997. p.229-261.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; WINER, W. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology Reproduction*. v. 38, n. 5, p. 1171-1180, 1988.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; HANDROW, R.H. et al. Capacitation of

- bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.*, v.40, n. 5, p.1020-1025, 1989.
- PEREIRA, R.J.T.A.; TULI, R.K.; WALLENHORST, S. et al. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A 23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 54, n. 2, p. 185-192, 2000.
- PHILLIPS, N.J.; MCGOWAN, M.R.; JOHNSTON, S.D. et al. Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 81, n. 1, p. 47-61, 2004.
- POPWELL, J.M.; FLOWERS, W.L. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. *Anim. Rep. Scien.*, v. 81, n. 1, p. 97-113, 2004.
- RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *American Society of Andrology*. V. 22, n. 2, p. 278-284, 2001.
- RATNER, N.; BUNGE, R.P.; GLASER, L. A neuronal cell surface heparan sulfate proteoglycan is required for dorsal root ganglion neuron stimulation of Schwann cell proliferation. *J. Cell. Biol.*, v.101, n. 3, p.744-754, 1985.
- RODRIGUES-MARTINEZ, H. Laboratory Sêmen Assessment and Prediction of Fertility: Still Utopia? *Reprod. Dom. Anim.* V. 38, n. 4, p. 312-318, 2003.
- ROTA, A.; PENZO, N.; VICENTI, L. et al. Hypoosmotic swelling (Hos) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 53, n. 7, p. 1415-1420, 2000.
- SISTEMA de análises estatísticas e genéticas. Viçosa, MG: UFV, 2001, 301p. (Manual do usuário).
- SALVADOR, D. F. *Perfis andrológicos, de comportamento sexual e desempenho reprodutivo de touros Nelore desafiados com fêmeas em estro sincronizado*. 2001. 53 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte.
- SALVADOR, D. F. *Perfis Cromatográfico e Eletroforético de proteínas com afinidade a Heparina do sêmen de touro da Raça Nelore e suas associações com a seleção andrológica, congelação do sêmen e Reação acromossômica, induzida (RAI)*, 2005. 57 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal). Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte.
- SCHRADER, S.F.; PLATEK, S.F.; ZANEVELD, L.J.D. et al. Sperm viability: A comparison of analytical methods. *Andrologia*, v. 18, n. 5, p. 530-538, 1986.
- SENGER, P. L. Spermatozoa in the female tract: transport, capacitation e fertilization. In: \_\_\_\_. *Pathways to pregnancy and parturition*. 2 ed. Moscow: Current conceptions, Inc, 2003. Cap.12, p.266- 283.
- SILVA, A. F. D.; COSTA, E. P. D.; OLIVEIRA, F. A. et al. Uso de dimetil formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. *Rev. Bras. Zoot.*, v. 35, n. 2, p. 452-456, 2006.
- SINGER, S.J.; NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes. *Science*. v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972.
- TARTAGLIONE, C.M.; RITA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen.

*Theriogenology*, v. 62, n.7, p. 1245-1252, 2004.

THOMAS, A.D.; MEYERS, SA; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*. v. 65, n. 8, p. 1531-1550, 2006.

VALE FILHO, V. R. Desenvolvimento testicular em touros: aspectos clínicos. *Animal Reproduction*, v. 1, n. 7, p. 418-438, 1988.

VALE FILHO, V. R. Padrões de sêmen bovino, para o Brasil: análise e sugestões. *Animal Reproduction*, v. 1, n. 8, p. 94-118, 1989.

VALE FILHO, V. R.; BERMANN, J. A. G.; ANDRADE, V. J. et al. Classificação andrológica por pontos (CAP), versus libido, na eficiência na fecundação de touros Nelore de 2 e 3 anos de idade, usados em estação de monta bem definida. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG, 14, 1994, *Anais...* Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, 1994, p. 88.

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, n. 4, p. 913-922, 1996.

WATSON, P.F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

WHITFIELD, C.H.; PARKINSON, T.J. Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin. *Theriogenology*, v. 38, n. 1, p. 11-20, 1992.

WHITFIELD, C.H.; PARKINSON, T.J. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). *Theriogenology*, v. 44, n. 3, p. 413-422, 1995.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N., et al. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI- Programme. *Intern. J. Of Androl.* v. 22, n. 4, p. 253-260, 1999.

