

DENISE SILVA OKANO

**AVALIAÇÃO *in vitro* DE SÊMEN CRIOPRESERVADO DE BOVINO E SUA
CORRELAÇÃO COM FERTILIDADE *in vivo***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

O41a
2015 Okano, Denise Silva, 1988-
Avaliação *in vitro* de sêmen criopreservado de bovino e
sua correlação com fertilidade *in vivo* / Denise Silva Okano. -
Viçosa, MG, 2015.
viii, 32f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.
Orientador : José Domingos Guimarães.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f.25-31.

1. Bovino - Reprodução. 2. Reprodução animal.
3. Sêmen - Criopreservação. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

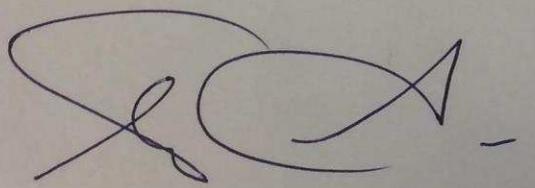
CDD 22. ed. 636.20824

DENISE SILVA OKANO

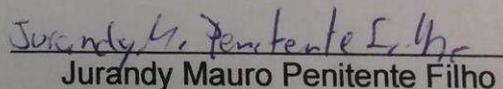
**AVALIAÇÃO *in vitro* DE SÊMEN CRIOPRESERVADO DE BOVINO E SUA
CORRELAÇÃO COM FERTILIDADE *in vivo***

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

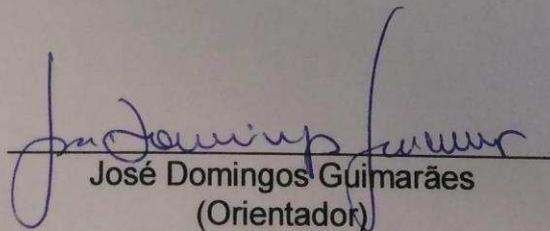
APROVADA: 24 de julho de 2015.



Eduardo Paulino da Costa



Jurandy Mauro Penitente Filho



José Domingos Guimarães
(Orientador)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (PI/FITC-PSA).....	6
2.2. Avaliação do potencial mitocondrial (JC-1).....	7
2.3. Avaliação da desorganização da bicamada lipídica (M540/6-DCFDA).....	7
2.4 Inseminação Artificial em Tempo Fixo.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1.Localização.....	9
3.2.Dados Experimentais.....	9
3.3. .Avaliação do sêmen “in vitro” da viabilidade espermática.....	10
3.4. .Preparo de amostras para avaliações pré-filtragem:.....	10
3.5. .Preparo de amostras para avaliações pós-filtragem.....	10
3.6. Motilidade espermática progressiva retilínea e Vigor espermático.....	11
3.7. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (IP/FITC-PSA).....	11
3.8. Avaliação do potencial mitocondrial (JC-1).....	12
3.9.Avaliação da organização da bicamada lipídica (M540/6CFDA).....	12
3.10. Análises estatísticas.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13

5. CONCLUSÕES.....	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
ANEXO.....	32

..

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1:** Percentual de prenhes obtida em rebanho da raça Nelore, submetidos à programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo – IATF, em manejo extensivo, de acordo com touros.....14
- TABELA 2:** Percentual de prenhes obtida em rebanho da raça Nelore, submetidos à programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo – IATF, em manejo extensivo, de acordo com grupos de fertilidade Satisfatória (% de prenhez >55 %) e Insatisfatória (% de prenhez <55 %)......15
- TABELA 3:** Média e desvios-padrão da Motilidade espermática e vigor espermático de sêmen descongelado de touros, avaliados por análises convencionais e após a filtragem do sêmen em solução coloidal (Androcoll®), de acordo com grupos de fertilidade Satisfatória (% de prenhez > 55 %) e Insatisfatória (% de prenhez < 55 %)......16
- TABELA 4:** Médias e desvios-padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal avaliadas em espermatozoides criopreservados de bovinos por citometria de fluxo.....17
- TABELA 5:** Valores médios e desvios-padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação ao potencial mitocondrial de espermatozoides criopreservados de bovinos avaliadas por citometria de fluxo.....19
- TABELA 6:** Valores médios e desvios-padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à produção de peróxido de hidrogênio, de sêmen criopreservado de bovinos avaliados por citometria de fluxo.....20
- TABELA 7:** Valores médios e desvios-padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação ao potencial mitocondrial de espermatozoides criopreservados de bovinos avaliadas por citometria de fluxo.....22
- TABELA 8:** Regressão logística multivariada de alterações na célula espermática do sêmen pós-descongelamento e prenhez de fêmeas bovinas.....23

RESUMO

OKANO, Denise Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Avaliação *in vitro* de sêmen criopreservado de bovino e sua correlação com fertilidade *in vivo*.** Orientador: José Domingos Guimarães.

Um dos problemas mais importantes da indústria da inseminação artificial é a determinação do potencial de fertilidade do sêmen, pois, as metodologias convencionais utilizadas para avaliar a qualidade de sêmen não têm demonstrado boa correlação com fertilidade dos espermatozoides. Resultados de recentes estudos com sêmen congelado-descongelados quando submetidos a uma filtração antes das avaliações espermáticas tem melhor correlação entre as características dos espermatozoides e a fertilidade *in vivo*. Além disso, a utilização de diferentes sondas fluorescentes nas análises do sêmen permitem avaliação ampla e individual dos espermatozoides, além de sua qualidade funcional, bioquímica e estrutural. Desde modo, o presente estudo teve como objetivo empregar diferentes testes complementares de avaliação espermática pré e pós-filtração em solução coloidal de sêmen criopreservado e verificar sua correlação com a fertilidade *in vivo*. Foram utilizadas duas amostras (palhetas da mesma partida) de sêmen congelado de 18 touros doadores de sêmen, sendo 11 reprodutores da raça Nelore, cinco Composto Montana Tropical, um Senepol, e um Red Angus, escolhidos de acordo com os animais utilizados em programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) imposto em um rebanho comercial. Os dados obtidos foram divididos de acordo com a fertilidade obtida após as inseminações, sendo fertilidade satisfatória (≥ 55 % de taxa de prenhez) e fertilidade insatisfatória (< 55 % de taxa de prenhez) Todas as fêmeas foram sincronizadas por uso de protocolos de sincronização e inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Os testes empregados para análise do sêmen foram motilidade e vigor espermático, análise quanto à integridade de membrana plasmática e acrossomal, produção de peróxido de hidrogênio intracelular, e organização da bicamada, por meio de sondas fluorescentes (IP, FITC-PSA, M540) empregando a Citômetria de fluxo. Houve efeito de touro sobre a taxa de prenhez ($P < 0,05$) com máximo de 76 % (19/25) e mínimo de 15,6 % (5/32) sendo a média de 54,6 % (723/1325) de prenhez com uma inseminação. Quanto aos grupos de fertilidade houve diferença ($P < 0,05$) entre as médias, sendo 62 % de prenhez para o grupo FERTILIDADE SATISFATÓRIA e 40,6 % para o grupo FERTILIDADE

INSATISFATÓRIA. Na avaliação convencional do sêmen, o grupo de fertilidade satisfatória apresentou maior média de motilidade espermática progressiva retilínea (60,49%) que o grupo de fertilidade insatisfatória. Nas avaliações realizadas por citometria de fluxo, o grupo de fertilidade insatisfatória obteve maiores médias percentuais para populações celulares com membrana plasmática lesionada e membrana acrossomal intacta (7,18 %), para células com alto grau de peroxidação e lesão de membrana plasmática (25,5 %) e menor média percentual de populações celulares com membrana plasmática íntegra e estável (19,5 %) que diferiram ($p < 0,05$) do grupo e fertilidade satisfatória. A centrifugação do sêmen em solução coloidal foi eficiente em reter as células com lesões na membrana plasmática e células com lesões na membrana acrossomal (16,8; 31,9 e 7,0 %); células com alta peroxidação intracelular (4,17; 64,3 e 15,0 %). Concluiu-se que as populações de espermatozoides com lesão na membrana acrossomal representam o maior percentual das células espermáticas em sêmen submetido ao processo de congelamento e relacionam-se com à alta taxa de fertilidade obtida em programa de inseminação artificial em tempo fixo (IATF); populações de espermatozoides com lesão de membrana plasmática e alta taxa de peroxidação intracelular estão relacionadas à baixa taxa de fertilidade em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF); a seleção de espermatozoides com membranas acrossomal e espermática intactas é possível pela centrifugação associado ao uso de soluções coloidais (Androcoll®) e a avaliação da motilidade espermática progressiva retilina está relacionada a alta taxa de fertilidade em programa de inseminação artificial em tempo fixo.

ABSTRACT

OKANO, Denise Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. ***In vitro* evaluation of cryopreserved bovine semen and its correlation with *in vivo* fertility.** Advisor: José Domingos Guimarães.

One of the most important problems of the artificial insemination industry is the determination of semen fertility potential for the conventional methods used to assess the quality of semen have not shown good correlation with fertility of sperm. Results of recent studies with frozen-thawed semen when subjected to filtering before the spermatic reviews have better correlation between the characteristics of sperm and fertility *in vivo*. In addition, the use of different fluorescent probes in semen analysis allow for a wide and individual assessment of sperm, as well as its functional, biochemical and structural. In this way, the present study aims to employ different complementary tests pre sperm and post-filtering in colloidal solution and check its correlation with fertility *in vivo* semen. Two samples were used (vanes in the same match) frozen semen of 18 donor bulls semen, 11 breeding Nelore five Composite Montana Tropical, one Senepol, and Red Angus, chosen according to the animals used in program Fixed-Time Artificial insemination (FTAI). It was previously established that the data obtained would be divided into fertility group, being satisfactory ($\geq 55\%$ pregnancy rate) and unsatisfactory ($< 55\%$ pregnancy rate) All females were synchronized by using synchronization protocols and fixed-time artificial insemination (FTAI). For data analysis of semen were motility and sperm vigor, analysis of the integrity of plasma and acrosomal membrane of intracellular hydrogen peroxide production, and organization of the bilayer by means of fluorescent probes (IP FITC-PSA, M540) in flow cytometer. There was bull effect on the pregnancy rate ($P < 0.05$) with a maximum of 76% (19/25) and a minimum of 15.6% (5/32) with a mean of 54.6% (723/1325) of pregnancy. As for fertility groups difference ($P < 0.05$) between the average, 62% of pregnancy for SATISFACTORY group and 40.6% for UNSATISFACTORY group. In conventional semen evaluation, the satisfactory group showed higher mean rectilinear motility (60.49%) than the poor group. In the assessments performed by flow cytometry, the UNSATISFACTORY group had higher average percentage for cell populations with damaged plasma membrane and intact acrosome membrane (7.18%; IP + PSA-) for cells with a high degree of peroxidation and plasma membrane injury (25.5%; DCFDA + PI +) and

lower mean percentage of cell populations with full and stable plasma membrane (19.5% M540-6DCFDA +) that differed ($p < 0.05$) SATISFACTORY group. The centrifugation of semen in colloidal solution was efficient in retaining the cells with lesions in the plasma membrane and cell injuries in the acrosome membrane (16.8% IP + PSA-; 31.9%, IP + PSA +, 7.0% IP-PSA +); cells with high intracellular peroxidation (4.17% DCFDA-PI +; 64.3% DCFDA + PI + 15.0%, + DCFDA PI). It was concluded that the populations of sperm with injury acrosome membrane represent the highest percentage of sperm cells in semen subjected to the freezing process and are related to the high fertility rate obtained in fixed-time artificial insemination (FTAI); sperm populations of plasma membrane damage and high intracellular peroxidation rate represent the highest percentages of sperm populations of cryopreserved semen, and are related to low fertility rate in fixed-time artificial insemination (FTAI); the selection of sperm with intact acrosome and sperm membranes is possible by centrifugation associated with the use of colloidal solutions (Androcoll®) and evaluation of sperm motility by light microscopy is related to high fertility rate in fixed-time artificial insemination (FTAI) program.

1. INTRODUÇÃO

Há aproximadamente 60 anos Buckner e Willett (1954) afirmaram que um dos problemas mais importantes da indústria da inseminação artificial é a determinação do potencial de fertilidade do sêmen. Ainda hoje os procedimentos de análise de sêmen pós-descongelamento é visto como fator limitante, por motivo das metodologias convencionais utilizadas *in vitro* para avaliar a qualidade de uma partida de sêmen não terem demonstrado boa correlação com a fertilidade do sêmen a campo.

O espermatozoide é uma célula complexa em que sua capacidade fecundante está relacionada a aspectos físicos e morfológicos do sêmen, como também aos aspectos bioquímicos dos espermatozoides e do plasma seminal. A célula espermática torna-se infértil quando um de seus fatores bioquímicos ou morfológicos é afetado (Siqueira et al., 2007). Então, a avaliação de apenas um desses aspectos não garante a condição de normalidade do outro. Portanto, a combinação de várias características em uma análise multifatorial é mais apropriada para diagnóstico da funcionalidade e integridade dos espermatozoides (Melo e Henry, 1999).

Nos centros produtores de sêmen criopreservados, em procedimentos de rotina, os principais parâmetros para avaliar a qualidade seminal de touros são a motilidade espermática progressiva retilínea e a morfologia espermática. Essas análises, apesar de servirem como padrão mínimo de qualidade da amostra de sêmen processada, servem também para a seleção de animais doadores de sêmen. No entanto, esses parâmetros tem se mostrado pouco eficaz quanto a capacidade de predizer o potencial de fertilidade do sêmen à campo (Siqueira et al, 2007).

Nem sempre os testes de rotina utilizados são suficientes para determinar a taxa de fecundação, visto que as avaliações de sêmen estão focadas na análise populacional dos espermatozoides, o que pode conduzir a erros, pois nem todas as características dos espermatozoides (morfologia e habilidade de fecundação) podem ser compensadas com a concentração de espermatozoides nos órgãos genitais feminino no momento da fecundação (Saacke et al., 1994).

Nesse sentido vários autores têm focado seus estudos em novos métodos para avaliação espermática como alternativa ou complementar aos exames de rotina para avaliação espermática (Tardif et al., 1999; Keel e Schalue, 2000; Verberckmoes et al., 2002; Tas et al., 2007). No entanto, os resultados desses testes

complementares têm variado bastante, mesmo empregando metodologias semelhantes (Amann et al., 1989). Dessa forma, Hallap e colaboradores (2004) sugeriram que uma fonte adicional de variação nos resultados desses estudos, poderia ser a presença de diluidores e agentes crioprotetores, e que o sêmen congelado-descongelado se submetido a uma “limpeza” antes das avaliações espermáticas resultaria em melhor correlação entre as características dos espermatozoides *in vitro* e a fertilidade *in vivo*.

Desde modo, o presente estudo tem como objetivo empregar diferentes testes complementares de avaliação espermática pré e pós filtragem em solução coloidal e verificar sua correlação com a fertilidade do sêmen *in vivo*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente, a monta natural é o método mais seguro para mensurar a fertilidade de um reprodutor, por meio da taxa de prenhez ou taxa de não retorno ao estro, porém esse processo é demorado e tem custo elevado (Hallap et al., 2004)

Por outro lado, as metodologias convencionais para avaliação espermática, como motilidade espermática progressiva retilínea, concentração e morfologia espermáticas são análises subjetivas, sendo influenciadas por alta variação entre análises e entre os técnicos observadores (Celeghini, 2005; Arruda, 2006). De acordo com Verstegen e colaboradores (2002) existem limitações destes métodos que são subjetividade, variabilidade, reduzido número de espermatozoides analisados e pobre correlação com o potencial fertilizante. Assim, vários testes são realizados *in vitro* na tentativa de obter correlações com a fertilidade a campo (Amann, 1989; Rodriguez-Martinez et al., 1997)

Tradicionalmente, a quantificação da qualidade espermática tem sido baseada na avaliação subjetiva, usando estimativa visual de parâmetros como motilidade massal e individual, contudo, estudos relatam existir variação de 30 a 60 % na estimativa desses parâmetros devido à limitação do ser humano em quantificar

as diferentes subpopulações espermáticas nas amostras de sêmen (Amann e Hammerstedt, 1980; Versteegen et al., 2002).

Graham et al. (1980) relataram que as correlações da fertilidade com as análises de motilidade espermática progressiva, morfologia e viabilidade espermática variaram de 0,06 a 0,86, e que nenhum ensaio forneceu resultados consistentes e correlações desejáveis com a fertilidade à campo. As correlações da fertilidade das amostras de sêmen e os resultados obtidos *in vitro* variaram nos diversos estudos revisados (correlações da fertilidade com motilidade espermática variaram de 0,15 a 0,84; da fertilidade com aspectos morfológicos variaram de 0,06 a 0,86; e correlações da fertilidade com viabilidade das células variaram de 0,33 a 0,66)(GRAHAM, 2001).

MARTINS (2009) não detectou diferenças entre as médias dos percentuais de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico de 420 touros jovens e 206 touros adultos aptos e inaptos à reprodução e da mesma forma, Bacinoglu et al. (2008) não verificaram diferenças nos resultados obtidos no teste hiposmótico de touros de baixa e alta fertilidade. Segundo Martins (2009) o teste hiposmótico pode ser limitado quanto a sua execução à campo, quando usado para prever a fertilidade de grande número de touros em sessões de exames andrológicos. Entretanto, Correa et al. (1997) verificaram diferenças entre as médias dos percentuais de espermatozoides reativos no teste hiposmótico dos touros classificados como de baixa e alta fertilidade, sendo 31,7 % para touros de baixa fertilidade e 41,9 % para touros de alta fertilidade.

Correa et al. (1997) e Bacinoglu et al. (2008) utilizando touros da raça Holandês e classificados de baixa e alta fertilidade em programas de inseminação artificial, não observaram diferenças na motilidade espermática progressiva retilínea após o descongelamento entre as classes de touros. Correlações médias e negativas foram observadas do percentual de espermatozoides lesados na coloração fluorescente em sêmen congelado com o teste supravital ($r=-0,32$) e a motilidade espermática progressiva retilínea após as 3 horas de incubação no teste de termorresistência ($-0,30$; MARTINS et al., 2011)

Para que a inseminação artificial possa apresentar melhores resultados, são necessários estudos mais amplos sobre vários aspectos relacionados à fisiologia da célula espermática e à melhoria da técnica aplicada para analisar a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides submetidos à refrigeração, congelamento e descongelamento, uma vez que, os danos ocasionados pela criopreservação causam prejuízos nas funções celulares, ocasionando a redução da fertilidade (ARRUDA, 2011)

O sêmen é constituído por grande população celular heterogénea e muitas das células são incapazes de fertilizar um ovócito (Holt e Van Vista, 2004; Rodriguez-Martinez, 2006, 2007). Muitos espermatozóides inférteis são filtrados ao passar pelos órgãos genitais da fêmea e então os espermatozóides selecionados atingem o oviduto. No entanto, nas avaliações *in vitro*, as amostras de sêmen são constituídas também por essas células inférteis (Holt e Van Vista, 2004; Rodriguez-Martinez, 2006, 2007).

Na tentativa de encontrarem correlação entre as características espermáticas e a capacidade fertilizante dos espermatozoides, Hallap e colaboradores (2004), submeteram o sêmen congelado/descongelado de bovino a dois métodos de “limpeza”, swim-up (SU) e centrifugação, para seleção das células viáveis e posterior avaliação. Após o procedimento de SU, observaram correlação ($r=0,50$; $p=0,03$) da motilidade espermática progressiva retilínea com a fertilidade à campo. Os autores concluíram ainda que, a motilidade espermática é um parâmetro valioso para estimar a fertilidade de touros quando avaliada após o processo de “limpeza” e seleção da população viável, visto que poderia fornecer mais informações para seleção de touros.

Para avaliação de sêmen equino, foi desenvolvido um método de seleção de espermatozóides de ejaculados de garanhão por meio de centrifugação em solução coloidal, que possui a capacidade de selecionar os espermatozóides móveis, com morfologia normal, membranas plasmáticas intactas e com boa integridade de cromatina (Morrell et al., 2009; Johannisson et al., 2009), de modo que, acredita-se que seleção de espermatozóides móveis após a centrifugação em soluções coloidais está ligada à parâmetros de qualidade do sêmen que afetam a fertilidade, e poderia ser um indicador do potencial de fertilidade (Morrell et al., 2014).

Apesar dos avanços nos estudos sobre a morfologia e viabilidade espermática *in vitro*, não há até o momento estudos consensuais sobre a correlação das análises *in vitro* com os resultados de fertilidade obtidos *in vivo*, o que dificulta prever o potencial de fertilização dos mesmos (Rodríguez-Martinez, 2006; Moce' e Grahamb, 2008).

O espermatozóide possui grande número de atributos, a fim de fertilizar um ovócito, a medição de um único atributo, motilidade espermática, por exemplo, irá produzir resultados que não se correlacionam bem com a fertilidade. Por isso, parece razoável que a medição simultânea de vários atributos dos espermatozoides em uma mesma população, propicie melhor estimativa do percentual de espermatozoides que realmente possa fertilizar um óvulo.

Nesse sentido, a utilização de diferentes sondas fluorescentes permite a análise ampla e individual dos espermatozoides, que associado ao uso do citômetro de fluxo permite avaliar grande número de células (40 a 60.000 células), além de sua qualidade funcional, bioquímica e estrutural (Gillan et al., 2005).

As sondas possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, diferindo assim dos corantes, o que permite o diagnóstico mais fácil e direto, dependendo de suas características físicas. Atualmente varias sondas fluorescentes tem sido empregadas isoladamente ou em associações, possibilitando a avaliação de diversos compartimentos espermáticos simultaneamente, por meio de microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo (Arruda et al., 2011).

A análise de rotina por microscopia de contraste de fase mensura pequeno número de espermatozoides dentro de uma população, demanda tempo maior e é uma análise subjetiva e individual. Já a citometria de fluxo é um método capaz de realizar medições objetivas de milhares de células em suspensão individualmente, e em poucos minutos adquire dados de subpopulações em amostra heterogênea de espermatozoides. Além disso, permite fazer uso de associações de sondas fluorescentes para avaliação simultânea de vários parâmetros como viabilidade celular, integridade acrossomal e potencial da atividade mitocondrial (Graham et al., 2001; Gillian et al., 2005).

2.1. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (PI/FITC-PSA)

Procedimentos de citometria de fluxo para avaliação espermática têm sido desenvolvidos para que se possa avaliar simultaneamente viabilidade da célula espermática, integridade de membrana, integridade de acrossoma e função mitocondrial. Para essa análise, “células viáveis” são definidas como aquelas que possuem membrana plasmática íntegra .

A marcação de viabilidade espermática pode ser abordada de duas maneiras: os fluorocromos podem marcar células viáveis, ou podem marcar células não viáveis .

Para avaliar a viabilidade, o fluorocromo utilizado é o iodeto de propídio (IP), que é uma sonda que marca células não viáveis e que tem afinidade pelo DNA da célula. Então as células que têm membrana plasmática danificada, permitem que o IP entre na célula, se ligue ao DNA e emita fluorescência vermelha (Graham et al., 1990; Wilhelm et al., 1996)

Wilhelm e colaboradores (1996) compararam a fertilidade dos espermatozóides criopreservados de garanhões, com números de avaliações de qualidade de sêmen feitas em laboratório e observaram que a viabilidade avaliada por citometria de fluxo usando IP, foi o único ensaio de laboratório que se correlacionou com a fertilidade dos garanhões à campo ($r=0,68$).

Outra sonda que avalia integridade de membrana plasmática é a diacetato de 6-carboxifluoresceína (6-CFDA) que é uma fluoresceína permeável à membrana celular. A 6-CFDA entra no espermatozóide através da membrana e dentro da célula ela é convertida por esterases intracelulares em um composto impermeável, ficando retida em células com membrana plasmática íntegra, que passa a emitir fluorescência verde (GILLAN et al., 2005).

A integridade acrosomal é analisada utilizando lecitinas vegetais marcadas com fluorescência. Inicialmente, a lecitina da ervilha marcada por fluorescência, a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) foi utilizado para avaliar a integridade acrosomal (Graham et al, 1990; Casey et al., 1993; Meyers et al, 1995; Wilhelm et al., 1996). A sonda PSA conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA) é uma sonda incapaz de penetrar a membrana acrossomal intacta.

Semelhante ao IP, a célula espermática contendo acrossoma intacto impede o PSA de entrar em contato com o conteúdo acrossomal ao qual se liga (Farlin et al.,

1992). Dessa forma, o espermatozoide possuindo o acrossoma intacto não cora quando incubado com PSA. Caso contrário, em que o acrossoma esteja lesionado, o PSA será capaz de entrar em contato com o conteúdo do acrossoma, se ligando α -manose e α -galactose da matriz acrossomal fazendo com que essa região emita fluorescência de cor verde (Farlin et al., 1992).

2.2. Avaliação do potencial mitocondrial (JC-1)

A rodamina 123 (R123) é uma sonda utilizada para avaliar a função mitocondrial do espermatozóide (Evenson et al., 1982; Auger et al., 1989; Graham et al., 1990). Ela é transportada para dentro da mitocôndria por meio da respiração ativa e se acumula nessa, emitindo fluorescência verde. Porém a R123 não permite a análise de diferentes taxas respiratórias entre as mitocôndrias. Porém, Thomas et al. (1998) usaram a sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide) para avaliar função mitocondrial de espermatozóides. Essa sonda permitiu a distinção entre organelas pouco ou altamente funcionais (Garner et al., 1997)

JC-1 é um corante catiónico lipofílico fluorescente, a carbocianina é internalizada por todas as mitocôndrias em funcionamento. Em mitocôndrias despolarizadas ou com baixo potencial de membrana, essa sonda emite fluorescência verde, que é característica da forma monomérica. Em mitocôndrias altamente funcionais/polarizadas, a concentração de JC-1 dentro das mitocôndrias formam agregados que apresentam fluorescência laranja.

De acordo com Gillian (2005) quando espermatozóides humanos foram divididos em grupos de potenciais mitocondriais alto, médio e baixo, com base na fluorescência de JC-1, as taxas de fertilização *in vitro* foram maiores no grupo de alto potencial do que no grupo de baixo potencial.

2.3. Avaliação da desorganização da bicamada lipídica (M540/6-CFDA)

A M540 é uma sonda lipofílica (Easton et al., 1978) com alta afinidade por membranas instáveis (Payan-Carreira et al., 2013), que emite fluorescência de cor laranja e é utilizada para detectar a desorganização fosfolipídica na camada externa da bicamada da membrana plasmática (Langner e Hui, 1993) e conseqüentemente o aumento da fluidez desta (Partyka et al., 2012) Já a 6-CFDA é uma fluorosceína permeável à membrana celular, que é convertida por esterases intracelulares em

composto impermeável, ficando retida em células com membrana plasmática íntegra (Gillan et al., 2005) que passa a emitir fluorescência verde.

2.4. Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)

Visando o aumento dos índices de produtividade e juntamente com a aceleração do melhoramento genético, a pecuária vem passando por processo de incorporação de tecnologia. Neste sentido, a inseminação artificial (IA) tem sido vista como a biotécnica mais importante incorporada aos sistemas de produção da pecuária (Sugulle et al., 2006), pois permite o aproveitamento e globalização de touros zootecnicamente superiores, se mostrando uma biotécnica prática para a obtenção de animais de maior mérito genético.

Porém, no Brasil com maioria de propriedades com sistema de criação extensivo e com deficiências básicas de manejo, dificultam a implantação de programas de IA. Segundo Oliveira et al. (2012) a procura e a observação do gado em estro se caracteriza como uma tarefa difícil e pouco eficiente. Além disso, a elevada incidência de estro pouco evidente em animais *Bos taurus indicus* é vista por Crespilho (2010) como limitação que pode se agravar ainda mais com o alto índice de fêmeas em balanço energético negativo e ou baixo escore de condição corporal (ECC), principalmente no pós-parto.

Entretanto, em virtude das dificuldades encontradas para a implementação da IA na maioria dos sistemas de produção, e, a partir do maior entendimento da fisiologia reprodutiva da fêmea bovina, diversos protocolos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e a ovulação têm sido desenvolvidos e empregados comercialmente (Pursley et al., 1995; Bó et al., 2003; Baruselli et al., 2004; Meneghetti et al., 2009; Vasconcelos et al., 2011), tornando possível a prática da inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Assim, além de representar importante ferramenta de manejo dos rebanhos bovinos por excluir a necessidade da observação de estro, a IATF diminui o impacto do anestro pós-parto e aumenta a taxa de serviço das propriedades, contribuindo efetivamente para maior ganho econômico e genético.

Assim há demanda de estudos relacionados com a qualidade do sêmen empregados em programas de IATF, que sejam realizados com o intuito de explorar as características seminais de diferentes touros e sua correlação com as taxas de concepção.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, e seguiu as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino e Pesquisa, processo número 07/2015, no dia 23 de abril de 2015, e as atividades durante o período experimental foram coordenadas pelo médico veterinário José Domingos Guimarães, CRMV-MG 5379.

3.1. Localização

A fase experimental a campo foi realizada na fazenda Derribadinha, de propriedade da empresa UNICAFÉ Agrícola S/A, localizada no Município de Carlos Chagas- MG, coordenadas 18°51' latitude sul e 41°55' longitude oeste, no período de abril a maio de 2015. Os animais foram criados em regime extensivo, com pastagem predominantemente de capim *Urochloa decumbens*, sal mineral e água *ad libitum*.

As avaliações Laboratoriais foram realizadas nos Laboratórios de Reprodução Animal do Departamento de Veterinária (DVT/UFV) e no Núcleo de Microscopia e Microanálise – NMM/UFV.

3.2. Dados Experimentais

Para este estudo foram utilizadas duas amostras (palhetas da mesma partida) de sêmen congelado de 18 touros doadores de sêmen, adquiridas pela fazenda Derribadinha em Centrais de Inseminação Artificial, regulamentadas como centros comerciais pelo MAPA, sendo 10 reprodutores da raça Nelore, cinco Composto Montana Tropical, um Senepol, um Holandês e um Red Angus, escolhidos de acordo com os animais utilizados em programa de Inseminação Artificial da fazenda, na estação reprodutiva 2014/2015, e que havia número mínimo de 20 vacas inseminadas para cada partida de sêmen.

Os dados de prenhez foram obtidos 30 dias do final da estação de monta (15/03/2015). Todas as fêmeas foram sincronizadas por uso de protocolos de sincronização e inseminação artificial em tempo fixo (IATF, protocolo Tecnopec® para vacas com bezerros ao pé ou paridas).

Previamente ao início da fase experimental, determinou-se a divisão dos dados a serem obtidos em dois grupos, sendo o grupo FERTILIDADE SATISFATÓRIA

composto pelos dados obtidos pelas amostras de sêmen congelado que resultaram em taxas de prenhez com valores iguais ou superiores a 55 %, sendo as mesmas consideradas satisfatória e grupo FERTILIDADE INSATISFATORIA composta por valores obtidos por amostras de sêmen congelado com taxas consideradas não satisfatórias, com valores inferiores a 55 % de prenhez. Tal valor de referência foi baseado em levantamento de dados de 31.982 IATFs realizadas em rebanhos em diversas regiões do Brasil, feito pelo Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, em que Baruselli e colaboradores (2012), consideraram índices satisfatórios de taxa de prenhez valores maiores que 50%.

Nas avaliações laboratoriais, os testes empregados para análises dos sêmens foram os testes convencionais (motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático) e análises com uso de sondas fluorescentes por meio de citometria de fluxo.

3.3. Avaliação do sêmen *in vitro* da viabilidade espermática

Para todas as análises, as amostras de sêmen de cada touro foram descongeladas mediante imersão das palhetas em banho maria a 37 °C por 30 segundos e aliqüotadas em dois microtubos de 1,5 mL (Ependorph®). Um microtubo foi usado para as avaliações sem a filtragem e outro foi usado para filtragem em solução coloidal (Androcoll®) e posteriormente realizou-se avaliações convencionais e em citometria de fluxo.

3.4. Preparo de amostras para avaliações pré-filtragem:

Inicialmente foi feita a concentração espermática das doses de sêmen em Câmara de Neubauer, com diluição em água destilada, na diluição de 1:100. Posteriormente em um microtubo de 2,5 mL, uma alíquota de sêmen foi diluída em DPBS para uma concentração de 5×10^6 espermatozóides/mL para realização das análises convencionais e com sondas fluorescente sem filtragem em solução coloidal.

3.5. Preparo de amostras para avaliações pós-filtragem:

O sêmen foi diluído na concentração de 40×10^6 sptz/mL em DPBS, e em seguida pipetado 250 µL dessa amostra sobre um mL da solução coloidal previamente aquecida a 37 °C e contida em tubo Falcon® de 15 mL. Nesta etapa

tomou-se o devido cuidado para que as duas fases (sêmen diluído/colóide) não se misturassem, pipetando o sêmen lentamente e com o tubo Falcon vertido em ângulo de aproximadamente 45 °. Os tubos foram centrifugados a 300 g por 15 minutos e o pelete ressuspendido em 1.400 µL de meio diluidor de sêmen a base leite e incubados novamente em banho maria a 37 °C por 15 minutos, e posteriormente realizou-se as avaliações convencionais e imediatamente incubados juntamente com a adição das sondas fluorescentes para análise em citometria de fluxo.

O sobrenadante das amostras centrifugadas foram pipetados em microtubos de 1,5 mL e diluídos em DPBS até completar o volume total desse recipiente e centrifugados novamente a 300 g por 15 minutos, o pelete então foi ressuspendido em diluidor de sêmen e incubados a 37 °C por 15 minutos para serem avaliados em análises convencionais e por citometria de fluxo.

3.6. Motilidade espermática progressiva retilínea e Vigor espermático

A motilidade espermática progressiva retilínea (0 – 100 %) e vigor espermáticos (escore de 0 – 5) foram avaliados nas amostras de semen pré, pós-filtragem e no sobrenadante com a deposição de 10 µL de sêmen entre lamina e lamínula previamente aquecidas a 38 °C, em aumento de 400 X em microscopia óptica (CBRA,1998).

3.7. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (IP/FITC-PSA)

Para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal foi empregado o protocolo proposto por Oliveira et al. (2012) modificado. Uma alíquota de 150 µL de sêmen diluído em PBS (5×10^6 sptz/mL) foi incubada com 10 µL de FITC-PSA (100 µg/mL; anexo) e 3 µL de IP (0,5 mg/mL; anexo) em microtubos plásticos (1,5 mL) dispostos em banho maria a 37 °C, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 150 µL de PBS e a amostra destinada à leitura no aparelho. Em todas as amostras foram analisadas 10.000 células espermáticas, numa taxa de aproximadamente 200 células/segundo, nos filtros A (FITC-PSA, lesão acrossomal) e C (IP, lesão de membrana plasmática) e excitação de 488 nm.

3.8. Avaliação do potencial mitocondrial (JC-1)

A análise do potencial mitocondrial foi determinado de acordo com protocolo proposto por Ortega-Ferrusola et al. (2010) modificado. Uma alíquota de 500 μL de cada amostra previamente diluída em meio PBS (5×10^6 spz/mL) foi incubada com 0,5 μL JC-1 (153 μM ; anexo) por 40 minutos em banho maria a 37 °C. Após esse período a amostra foi destinada à leitura no aparelho de citometria de fluxo. Nesta avaliação foram analisadas 10.000 células por amostra, com taxa de aproximadamente 200 células/segundo, com os filtros A (JC-1 monômeros) e B (JC-1 agregados) e excitação de 488 nm.

3.9. Avaliação da organização da bicamada lipídica (M540/6CFDA).

Para análise da estabilidade da membrana plasmática, uma alíquota de 150 μL do sêmen diluído em meio PBS (5×10^6 spz/mL) foi adicionada a um microtubo (1,5 mL) aquecida em banho maria a 37 °C, e corada com 0,5 μL M540 (0,5 mg/mL) e 3 μL de 6CFDA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 15 minutos. Após esse período foi adicionado 150 μL de PBS na amostra, e posterior leitura no aparelho e citometria e fluxo. Total de 10.000 células foram analisadas, com taxa de 400 células/segundo, com os filtros A (6CFDA, células viáveis), B (M540, desorganização de membrana) e C (células não viáveis) e excitação de 488 nm.

3.10 Análises estatísticas

Todos os dados obtidos foram submetidos as análises estatísticas descritivas para obtenção das médias e desvios-padrão. Para a característica taxa de prenhez, os dados foram submetidos a análise de qui-quadrado, e probabilidade de erro de 5 %. Os valores quantitativos foram submetidos aos testes de Lilliefors e Bartlett e Cochran para avaliar, respectivamente, a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias entre os grupos e posteriormente submetidas à ANOVA. As médias dos grupos foram comparadas pelo teste F, com probabilidade de erro de 5 %. Para as análises empregou-se o programa estatístico SAEG 9,1 (SAEG/UFV, 2007).

Para avaliar o efeito das lesões espermáticas sobre a taxa de prenhez foi usada regressão logística multivariada (SAS-2002) usando delineamento inteiramente aleatório de acordo com modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + C_j + (FC)_{ij} + e_{ijk}$$

Onde: Y_{ijk} = resposta; μ = constante; F_i = efeito sobre a fertilidade do grupo (satisfatória e insatisfatória); C_j = efeito sobre a filtragem por centrifugação; $(FC)_{ij}$ = interação; e e_{ijk} = erro.

Para isso, foram obtidos dois modelos, um com sêmen não filtrado e outro com sêmen filtrado. Apenas variáveis explicativas que foram significativas em $P < 0,25$ foram mantidos para o modelo final. Os dois modelos foram comparados pelo curva ROC (receiver operator characteristic), a fim de avaliar qual deles, não filtrado ou filtrado, mostrou o melhor ajuste para a taxa de prenhez.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o encerramento da estação de monta foram obtidas as taxas de gestação geral e por touro individualmente. No total de 1325 vacas, obteve-se 723 animais gestantes (54,6%), com percentual por touro máximo de 76 % e mínimo de 15,6 % (TABELA 1), constatando-se diferença entre os mesmos ($P < 0,05$).

Martins Júnior e colaboradores (2012) obtiveram resultados semelhantes quanto a variação individual de machos na taxa de gestação utilizando 4 touros e 962 fêmeas em programa de IATF, em que observaram máximo de 61,1 % e mínimo de 45,5 % de prenhez, porém com variação menor (15 %) do que encontrado neste trabalho 60,4%.

TABELA 1: Percentual de prenhez obtida em rebanho da raça Nelore, submetidos à programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo – IATF, em manejo extensivo, de acordo com touros.

Touros	Gestações	%	Total
1	19	76,0	25
2	47	73,4	64
3	37	64,9	57
4	115	64,6	178
5	36	61,0	59
6	86	60,1	143
7	68	59,1	115
8	34	58,6	58
9	31	58,5	53
10	19	57,6	33
11	44	55,0	80
12	22	51,2	43
13	24	50,0	48
14	59	46,1	128
15	15	44,1	34
16	47	35,9	131
17	15	34,1	44
18	5	15,6	32
Geral	723	54,6	1325

Semelhante ao presente estudo, Sá Filho et al. (2009) observaram grande variação na taxa de gestação dos touros empregados em seu estudo utilizando protocolos de IATF. Tais variações, quando observadas *in vitro* e relacionadas aos resultados obtidos à campo, também apresentam grande variação quanto à fertilidade de amostras de sêmen criopreservado de touros empregados na produção *in vitro* de embriões (PIV), avaliações *in vitro* da capacitação, integridade acrossomal, taxa de clivagem e de formação de blastocistos. (Marquant-Le Guienne et al., 1990, Brown et al., 1991, Zhang et al., 1997; Wei e Fukui, 1999; Sudano et al., 2011).

Quando se agrupou os resultados de taxa de gestação em FERTILIDADE SATISFATORIA e FERTILIDADE INSATISFATORIA, baseado nos aspectos econômicos da viabilidade desta biotécnica (Baruselli et al., 2012), verificou-se que 60,1 % dos touros apresentaram taxa satisfatória de prenhez e 39,9 % dos touros compuseram o grupo de fertilidade INSATISFATÓRIA, havendo diferença entre os grupos ($P < 0,05$; tabela 2). Valores inferiores aos obtidos neste estudo foram registrados por Baruselli et al. (2012; <http://www.mastergenetics.com.br/wp-content/uploads/2012/05/Efeito-individual-de-touros.pdf>) que em levantamento de

dados de 31.982 IATFs realizadas em rebanhos em diversas regiões do Brasil verificaram que somente 50,7 % dos touros utilizados alcançaram índices satisfatórios (≥ 50 % de prenhez por inseminação).

Quanto aos aspectos físicos do sêmen após o descongelamento (tabela 3) observou-se diferenças na motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático imediatamente após o descongelamento e após a filtragem em solução coloidal ($P < 0,05$) entre os dois grupos estudados.

TABELA 2: Percentual de prenhes obtida em rebanho da raça Nelore, submetidos à programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo – IATF, em manejo extensivo, de acordo com grupos de fertilidade Satisfatória (% de prenhez >55 %) e Insatisfatória (% de prenhez <55 %).

Grupos	Gestantes	Não Gestantes	Total
Satisfatória	536 (62%)A	329 (38%)	865 (62,3%)
Insatisfatória	187 (40,6%)B	273 (59,4%)	460 (34,7%)
Geral	723 (54,6%)	602 (45,4%)	1325 (100%)

Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,5$) pelo teste χ^2 .

Ressaltando que o uso da avaliação de motilidade espermática progressiva retilínea é útil em tentar prever sobre a fertilidade do sêmen. Tal fato descrito por Olds-Clarke (1996) que verificou que a motilidade espermática é umas das características mais importantes associadas ao potencial de fertilização, onde o autor correlacionou a ausência de movimento espermático e os quadros de infertilidade. Por isso, mesmo sendo estimada de forma subjetiva pela avaliação visual sob microscopia óptica convencional, é em termos práticos, a principal análise laboratorial utilizada pelas centrais de inseminação artificial (Arruda et al., 2005, Crespilho et al., 2006).

TABELA 3: Média e desvios-padrão da Motilidade espermática e vigor espermático de sêmen descongelado de touros, avaliados por análises convencionais e após a filtragem do sêmen em solução coloidal (Androcoll®), de acordo com grupos de fertilidade Satisfatória (% de prenhez > 55 %) e Insatisfatória (% de prenhez < 55 %).

Grupos	Motilidade Espermática Retilínea	Vigor Espermático
<i>Convencional</i>		
Satisfatória	60,49±11,08A	2,76±0,43A
Insatisfatória	52,31±19,31B	2,49±0,50B
Geral	57,65±14,98	2,67±0,48
<i>Pós-Filtragem</i>		
Satisfatória	17,14±22,70A	1,1±0,99B
Insatisfatória	15,09±13,81B	1,8±1,13A
Geral	16,75±21,30	1,24±1,06

Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna e entre grupos diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste F.

Em relação aos testes complementares com uso das sondas fluorescentes, também se observou diferenças nos valores médios obtidos para os diferentes grupos estudados. Com o uso das sondas FITC/PSA e PI para análise da integridade de membrana espermática e acrossomal, verificou-se diferença entre os valores médios para cada população espermática entre os dois grupos e nas diferentes etapas de avaliações (pós-descongelamento, pélete e no sobrenadante após a centrifugação) ($P < 0,05$; tabela 4).

Para o sêmen pós-descongelamento, no grupo de fertilidade satisfatória se obteve maior porcentagem de espermatozoides com lesão de acrossoma (IP+PSA+ 9,32 % e IP-PSA+ 3,33 %) comparados ao grupo de fertilidade insatisfatória (IP+PSA+ 2,65 % e IP-PSA+ 0,70 %; tabela 4). A sonda PSA tem afinidade com a membrana acrossomal externa no momento em que esta é exposta, portanto a marcação ocorre antes da observação de extrusão acrossomal tornando esse fluorocromo um método de detecção mais precoce.

Sabendo que, a membrana plasmática dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação sofrem alterações semelhantes às aquelas observadas durante a capacitação (Cormier e Bailey 2003; Green e Watson, 2001; Neild et al., 2003), essa reação precoce do acrossoma observado no grupo FERTILIDADE SATISFATÓRIA em relação ao grupo FERTILIDADE INSATISFATÓRIA pode ter

favorecido a fertilização, já que as fêmeas foram submetidas ao protocolo de IATF e provavelmente as inseminações foram efetuadas próximas as ovulações, o que permitiriam a fusão à zona pelúcida mais precocemente pelos espermatozoides.

Além desse fato, a população com membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada (IP-PSA+) no grupo FERTILIDADE SATISFATÓRIA foi maior do que no grupo FERTILIDADE INSATISFATÓRIA.

TABELA 4: Médias \pm desvios-padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal avaliadas em espermatozoides criopreservados de bovinos.

Grupos	IP+PSA-	IP+PSA+	IP-PSA+	IP-PSA-
<i>Pós-descongelamento</i>				
Satisfatória	6,78 \pm 3,89B	9,32 \pm 5,15A	3,33 \pm 2,10A	80,56 \pm 8,63B
Insatisfatória	7,18 \pm 5,50A	2,65 \pm 4,91B	0,70 \pm 1,00B	89,47 \pm 8,78A
Geral	6,92 \pm 4,51	7,00 \pm 5,9	2,42 \pm 2,19	83,66 \pm 9,66
<i>Pós-Filtragem</i>				
Satisfatória	2,60 \pm 1,80B	0,50 \pm 1,04B	0,09 \pm 0,22B	96,83 \pm 2,47A
Insatisfatória	2,96 \pm 2,87A	1,44 \pm 2,42A	1,68 \pm 3,46A	93,94 \pm 5,54B
Geral	2,73 \pm 2,24	0,82 \pm 1,71	0,64 \pm 2,18	95,82 \pm 4,07
<i>Sobrenadante</i>				
Satisfatória	16,83 \pm 8,12A	31,93 \pm 14,62A	7,01 \pm 7,26A	44,23 \pm 15,12B
Insatisfatória	16,14 \pm 6,64B	23,28 \pm 16,60B	6,23 \pm 7,41B	54,37 \pm 16,80A
Geral	16,59 \pm 7,64	28,92 \pm 15,87	6,74 \pm 7,32	47,75 \pm 16,44

Valores médios seguidos por letras maiúsculas na mesma coluna e entre grupos diferentes entre si ($p < 0,05$) pelo teste F. IP+PSA-: percentuais de espermatozoides com membrana plasmática lesionada; IP+PSA+: percentuais de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesionada; IP-PSA+: percentuais de espermatozoides com acrossoma lesionado; e IP-PSA-: percentuais de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras.

Na avaliação do sêmen após a centrifugação, no grupo FERTILIDADE INSATISFATÓRIA (tabela 4) observou-se maiores valores médios para todas as populações celulares com lesões (IP+PSA- IP+PSA+, IP-PSA+), exceto para aquela que indica células com as membrana plasmática e acrossoma íntegras (IP-PSA-). Essa população de células íntegras teve comportamento diferente nas análises do sêmen pós-descongelamento, onde se verificou maior média para o grupo FERTILIDADE INSATISFATÓRIA (89,47 %; tabela 4). Isso se deve à filtragem que ocorre através do Androcoll®, separando as populações de espermatozoides de

melhor qualidade, que representa minoria da população total analisada. Assim, na análise pós-filtragem, a média de células viáveis verificada no grupo FERTILIDADE SATISFATÓRIA foi de 96,85 %, sendo maior ($P < 0,05$) que o grupo FERTILIDADE INSATISFATÓRIA. Este resultado demonstra a eficiência da técnica de centrifugação em camada única, para selecionar populações espermáticas com membranas intactas, o que poderia significar incremento na taxa de prenhez. Tais observações corroboram aos estudos de Morrell e Rodriguez Martinez (2010) que demonstraram que a qualidade de sêmen de garanhões é melhorada após serem submetido à centrifugação usando Androcoll-E®, selecionando populações de células com morfologia normal e membranas plasmáticas intactas, além da qualidade dos aspectos físicos (Johannisson et al. 2009, Morrell et al., 2009).

Com relação as análises dos espermatozoides no sobrenadante após a centrifugação, a média das células com algum tipo de lesão (IP+PSA-, IP+PSA+, IP-PSA+) foram maiores no grupo FERTILIDADE INSATISFATÓRIA (tabela 4), ou seja, a maioria dos espermatozoides avaliados mostrava-se de baixa qualidade, que foram retidos no sobrenadante durante o processo de filtragem, o que corrobora aos autores citados anteriormente sobre a eficiência do processo de filtragem.

A merocianina (M540) permite detectar a desorganização de fosfolipídios da membrana plasmática e conseqüentemente a desestabilização da mesma. As avaliações de desorganização de membrana do sêmen pós-descongelamento, apesar da população de células com membrana plasmática instável e lesadas (2,16 %; tabela 5) terem sido maior ($p < 0,05$) no grupo de FERTILIDADE SATISFATÓRIA comparado ao grupo FERTILIDADE INSATISFATÓRIA, a porcentagem dessa população celular é menor do que a população de células com membrana plasmática íntegra e estável (20,09 %) no mesmo grupo, sendo maior no grupo FERTILIDADE INSATISFATÓRIA. Portanto, essa última população de células viáveis provavelmente conseguiu compensar o percentual de células danificadas e resultou em maior taxa de prenhez,

Além disso, assim como nos resultados em relação às populações espermáticas quanto à integridade de membrana plasmática e acrossomal, a desorganização da membrana plasmática detectada pela M540 é semelhante à que ocorre durante as primeiras etapas da capacitação, uma vez que essa desordem de fosfolipídeos é induzida pelo aumento de bicarbonato intracelular, que ocorre no início desse processo de capacitação (Hallap et al., 2006). O fato das fêmeas

estarem dentro do programa de IATF, com o estro e a ovulação sincronizadas, pode novamente ter aumentado as chances da população de espermatozoides com membrana plasmática instável e lesadas (M540+6DCFDA-) terem sucesso em fertilizar o ovócito.

O sêmen após a filtragem apresentou maiores valores médios no grupo FERTILIDADE INSATISFATÓRIA para características de membrana íntegra (6DCFDA+), porém a porcentagem de células mortas (92,5 %; M540-6DCFDA-) se sobressaiu sobre o grupo FERTILIDADE SATISFATÓRIA (tabela 5).

Na avaliação dos espermatozoides pós-descongelamento e dos espermatozoides no sobrenadante após a filtragem na solução coloidal, apenas as médias das populações células viáveis e com membrana instável (M540+6DCFDA+; tabela 5) não apresentaram diferença entre os grupos de fertilidade ($P>0,05$). Sendo que para os espermatozoides pós-filtrados, essa população foi maior no grupo FERTILIDADE INSATISFATÓRIA, assim como as demais populações celulares ($P<0,05$).

TABELA 5: Valores médios e desvios-padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação ao potencial mitocondrial de espermatozoides criopreservados de bovinos.

Grupos	M540+6DCFDA-	M540+6DCFDA +	M540-6DCFDA +	M540-6DCFDA -
<i>Pós-descongelado</i>				
Satisfatória	2,16±2,08A	6,96±6,76A	20,08±15,59A	70,78±16,65B
Insatisfatória	0,66±0,29B	7,17±4,82A	19,51±15,95B	72,65±14,98A
Geral	1,64±1,83	7,03±6,16	19,88±15,72	71,43±16,10
<i>Pós-filtragem</i>				
Satisfatória	1,46±0,47B	4,06±4,10B	1,95±2,01B	88,97±9,80B
Insatisfatória	1,88±0,89A	11,83±9,50A	3,56±4,10A	92,52±5,78A
Geral	1,62±0,68	6,88±7,58	2,54±3,04	82,75±12,05
<i>Sobrenadante</i>				
Satisfatória	27,19±20,33A	31,16±16,67A	31,69±15,56A	26,45±9,35B
Insatisfatória	15,17±18,39B	32,69±13,2A	14,82±8,30B	37,34±12,04A
Geral	23,01±20,49	31,69±15,56	15,06±6,07	30,24±11,59

Valores médios seguidos por letras maiúsculas na mesma coluna e grupos diferem entre si ($p<0,05$) pelo teste F. M540+6DCFDA-: percentuais de células mortas e membrana instável; M540+6DCFDA+: percentuais de células viáveis e membrana instável; M540-6DCFDA+: percentuais de células viáveis e membrana estável; M540-6DCFDA-: percentuais de células mortas e membrana estável.

Com relação ao estresse oxidativo, os estudos anteriores demonstraram que o mesmo mostra-se relacionados à funcionalidade dos espermatozoides, tanto nas análises à campo como *in vitro*. As espécies reativas de oxigênio (ROS) têm papel fundamental na fisiologia espermática (Aitken et al., 2004, O'Flaherty et al., 2006, De Lamirande e O'Flaherty, 2008), porém a excessiva produção de ROS e/ou falha nos mecanismos de proteção antioxidante causam danos aos espermatozoides (Shen e Ong, 2000; Aitken e Baker, 2002; Agarwal et al., 2003). No presente estudo, na avaliação do sêmen pós-descongelamento, a população de células com alto grau de peroxidação juntamente com lesão de membrana plasmática (DCFDA+PI+) foi observada em maior porcentagem para o grupo FERTILIDADE INSATISFATÓRIA (25,5 %; tabela 6), neste grupo também houve maior valor para células com lesão de membrana plasmática (DCFDA-PI+), e, além disso, apresentou menor valor para população de células viáveis e baixa peroxidação (DCFDA-PI-). Provavelmente o grau de produção de ROS intracelular foi excessivamente alto causando toxicidade à célula, ou houve falha no processo de produção de antioxidantes comprometendo a função espermática e refletindo na taxa de gestação.

TABELA 6: Valores médios e desvios-padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à produção de peróxido de hidrogênio, de sêmen criopreservado de bovinos.

Grupos	DCFDA-PI+	DCFDA+PI+	DCFDA+PI-	DCFDA-PI-
Pós-descongelado				
Satisfatória	1,81±1,70B	22,09±19,95B	6,61±9,27A	69,51±23,50A
Insatisfatória	4,07±4,49A	25,52±16,77A	2,28±3,86B	68,08±17,65B
Geral	2,59±3,17	23,28±18,97	5,11±8,09	69,01±17,65
Pós-filtragem				
Satisfatória	6,14±2,94A	9,29±7,74A	0,76±0,35B	83,83±7,75B
Insatisfatória	3,40±4,32B	8,89±5,46B	1,01±0,35A	86,72±8,45A
Geral	5,19±3,72	9,15±7,04	0,85±0,37	84,84±8,11
Sobrenadante				
Satisfatória	4,17±1,91A	64,31±8,78A	15,06±8,76A	16,48±9,29B
Insatisfatória	3,52±1,63B	52,52±18,47B	12,15±4,47B	31,82±14,78A
Geral	3,95±1,84	60,22±14,15	14,05±7,67	21,80±13,62

Valores médios seguidos por letras maiúsculas na mesma coluna e grupos diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste F. DCFDA-PI+: espermatozoides mortos com baixa produção de peróxido de hidrogênio; DCFDA+PI+: espermatozoides mortos com alta produção de peróxido de hidrogênio; DCFDA+PI-: espermatozoides vivos com alta produção de peróxido de hidrogênio; DCFDA-PI-: espermatozoides vivos com baixa produção de peróxido de hidrogênio.

Como eram esperados, para a análise dos espermatozoides no sobrenadante, as maiores médias percentuais de células com lesão na membrana plasmática e maior grau de oxidação foram verificadas no grupo FERTILIDADE INSATISFATÓRIA ($P < 0,05$; tabela 6), que neste caso, demonstra a eficiência do ANDROCOLL® em reter células com funcionalidade comprometida.

As avaliações do sêmen pós-descongelamento e pós- filtragem apresentaram alta porcentagem de células não coradas, no entanto, o percentual de células com alto potencial mitocondrial mostrou-se maior nas avaliações pós-filtragem com valor de 79,7 % no grupo FERTILIDADE SATISFATORIA e 92,94 % no grupo FERTILIDADE INSATISFATORIA. Para o sêmen pós-descongelamento o valor foi de 37,8 % e 95,7 %, do total de células coradas, respectivamente (tabela 7), mostrando diferença favorável ao grupo FERTILIDADE SATISFATORIA com 21,39 % do alto potencial mitocondrial versus 13,73 % para o grupo FERTILIDADE INSATISFATÓRIA. Entretanto, quando se considera porcentagem de células com alto potencial mitocondrial, somente entre células coradas, observa-se alta porcentagem de células com potencial mitocondrial no grupo FERTILIDADE SATISFATORIA. Este mesmo comportamento foi observado quando se analisou os espermatozoides pós-filtragem e o sobrenadante. Tais observações demonstram independente da análise estatística obtida com os dados (tabela 7), a estimativa percentual das células com alto potencial mitocôndrial somente entre células coradas indicam que esta característica provavelmente não contribuiu para as diferenças observadas nos valores médios das taxas de gestação nos grupos estudados.

TABELA 7: Valores médios e desvios-padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação ao potencial mitocondrial de espermatozoides criopreservados de bovinos.

Grupos	APM	BPM	Não Corados	Corados
Pós-descongelado				
Satisfatória	21,39±12,63A (37,8)	35,17±33,85A(62,2)	40,71±35,66B	56,56
Insatisfatória	13,73±11,40B (95,7)	0,79±0,82B (4,26)	84,45±12,08A	18,52
Geral	18,73±12,63	23,22±31,87	55,91±36,25	
Pós-filtragem				
Satisfatória	3,25±2,74B (79,7)	0,66±0,55A (20,31)	95,59±3,61A	3,91
Insatisfatória	8,03±11,68A (92,9)	0,61±0,86B (7,06)	90,35±13,52B	8,64
Geral	4,98±7,70	0,64±0,68	93,70±8,98	
Sobrenadante				
Satisfatória	23,77±9,90B (29,0)	58,09±14,28A (70,96)	17,99±13,85B	81,86
Insatisfatória	46,37±20,49A (63,3)	26,87±24,94B (36,64)	25,41±13,38A	73,19
Geral	30,17±17,11	49,24±22,80	20,09±14,11	

Valores médios seguidos por letras maiúsculas na mesma coluna e grupos diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste F. APM: alto potencial mitocondrial; BPM: baixo potencial mitocondrial.

Quando os dados foram avaliados por meio de regressão logística multivariada (SAS,2002) as características dos espermatozoides do sêmen pós-descongelamento que mais influenciaram para aumentar a taxa de prenhez foram aqueles com membrana plasmática e acrossomal lesadas (FITC+PSA+), Baixo potencial mitocondrial (BPM) e membrana organizada e lesada (MERO+6CDCFDA-). Sendo que, o aumento de um por cento na população de FITC+PSA+, BPM e MERO+6CDCFDA-, aumenta respectivamente em 1,051, 1,006 e 1,097 as chances da fêmea tornar-se gestante (tabela 8).

Os resultados de membrana plasmática e acrossomal lesadas (FITC+PSA+), e desorganização de membrana (MERO+6CDCFDA-) terem influência para o aumento da taxa de prenhez corroboram com a hipótese anteriormente mencionada, de que as alterações causadas nos espermatozoides pela criopreservação, semelhantes à capacitação espermática (criocapacitação), neste estudo mostrou-se favorável a fertilidade. Levando em conta que as inseminações foram realizadas em tempo determinado pelo programa de IATF, na tentativa de se aproximar o quanto possível do momento da ovulação.

Em estudos com espermatozoides criopreservados vários autores afirmam que células criocapacitadas estão aptas a culminar com a reação acrossômica ou,

até mesmo fertilizar oócitos *in vitro* (Péres et al.,1996; Cormier et al.,1997; Gillan et al.,1997; Maxwell e Johnson, 1997). Além disso, observaram que quase todos os espermatozoides apresentavam mudanças semelhantes à capacitação (criocapacitação) após o descongelamento (Fuller e Whittingham,1996).

Andrade (2009) realizou um estudo com sêmen equino, avaliando por citometria de fluxo a capacitação espermática, e sugeriu que, no sêmen *in natura* as células identificadas como capacitadas, poderiam ser consideradas as responsáveis por fertilizar o ovócito nas fêmeas que receberam a cobertura ou IA em períodos próximos ou até mesmo pós-ovulatório. Levando o mesmo a acreditar que estas células capacitadas não necessitariam permanecer no órgão genital feminino para ser tornarem aptos a fertilizar o ovócito, estando as mesmas já capacitadas e prontas para esse evento..

TABELA 8. Regressão logística multivariada de alterações na célula espermática do sêmen pós-descongelamento e prenhez de fêmeas bovinas.

Parâmetro	Taxa de Probabilidade	P
FITC+PSA+,	1,051	<0,0001
BPM	1,006	0,0003
MERO+6CDCFDA-	1,097	0,0013

FITC+PSA+: Membrana plasmática e acrossomal lesadas; BPM Baixo potencial mitocondrial; MERO+6CDCFDA-:Membrana organizada e lesada; p<0,05;

$$\text{Valor de Probabilidade } P = \frac{e^{(-0.4518 + (0.0494 \times FITCQ_2) + (0.0064 \times JC1Q_3) + (0.0924 \times MEROQ_1))}}{1 + e^{(-0.4518 + (0.0494 \times FITCQ_2) + (0.0064 \times JC1Q_3) + (0.0924 \times MEROQ_1))}}$$

5 CONCLUSÕES

No presente estudo pode-se concluir que:

- Populações de espermatozóides com lesão na membrana acrossomal representam o maior percentual das células espermáticas em sêmen submetido ao processo de congelamento e relacionam-se com à alta

taxa de fertilidade obtida em programa de inseminação artificial em tempo fixo – IATF;

- Populações de espermatozoides com lesão de membrana plasmática e alta taxa de peroxidação estão relacionadas à baixa taxa de fertilidade em programas de inseminação artificial em tempo fixo – IATF;

A seleção de espermatozoides com membranas acrossomal e espermática intactas é possível pela centrifugação associado ao uso de soluções coloidais (Androcoll®).

A avaliação da motilidade espermática progressiva retilínea por microscopia optica esta relacionada à alta taxa de fertilidade em programa de inseminação artificial em tempo fixo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.79, p.829–843. 2003.
- AISEN, E.; QUINTANA, M.; MEDINA, V.; MORELLO, H.; VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology** v.50, p.239–249, 2005.
- AITKEN, R.; WINGATE, J.; DE IULLIS, G.; MCLAUGHLIN, E. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**, v.13, p.203-211. 2007.
- AITKEN, R.J. e BAKER, M.A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v.25 191–194. 2002.
- AITKEN, R.J.; RYAN, A.L.; BAKER, M.A.; MC LAUGHLIN, E. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **Free Radical Biology & Medicine**, v.36, p.994–1010. 2004.
- AMANN RP. Can the fertility potential of a seminal sample predicted accurately? **Journal Andrology**, v.10, p. 89–98. 1989.
- ARMSTRONG, J.S; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM,W.J. ;SIKKA, S.C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine** v.26, p.869–880. 1999.
- ARRUDA, R. P; SILVA, D. F; AFFONSO, F. J; LEMES, K. M; JAIMES, J. D; CELEGHINI, E. C. C; ALONSO, M. A; CARVALHO, H. F; OLIVEIRA, L. Z; NASCIMENTO, J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros / Methods of the assessment of morphology and function of sperm: actual moment and future challenges. **Revista Brasileira Reprodução Animal** v.35(2). p.145-151, 2011
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; PERES, K.R.; NEVES, L.C. Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF. In: **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 2, Londrina, PR. p.157-164, 2006.
- AUGER, J.; RNOT, X.; DADOUNE, J.P. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. **Journal Andrology**. v.10, p. 439–448, 1989.
- BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BÓ, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**., v.82–83, p.479–486, 2004.
- BARUSELLI P.S.; SALES, J.N.S.; SALA,R.V.; VIEIRA, L.M.; SÁ FILHO, M.F.. History, evolution 298 and perspectives of timed artificial insemination programs in

Brazil. **Animal Reproduction** 9, 139–152. Available on: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v9n3/pag139-152%20\(AR536\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v9n3/pag139-152%20(AR536).pdf), 2012.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**. v.78, p.307–326. 2003.

BUCKNER, P.J.; WILLETT, E.L. Laboratory tests, singly and in combination, for evaluating fertility of semen and of bulls. **Journal Dairy Science**. v. 37, p.1050–1060, 1954.

CASEY, P.J.; HILMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBNIS, E.Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal Andrology**. v.14, p. 289–297, 1993.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3ª ed. Belo Horizonte. 2013. 104p.

CRESPILHO, A.M. Avaliação de diferentes metodologias de preservação do sêmen bovino para a utilização em programas de inseminação artificial em tempo-fixado (IATF). 2010. 97f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária.

CORMIER, N.; BAILEY, J.L. A differential mechanism is involved during heparin-and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. **Biology and Reproduction**, v.69, p.177–185, 2003.

DE LAMIRANDE, E.; O'FLAHERTY, C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1784, p.106–115. 2008.

EASTON, T.G.; VALINSKY, J.E.; REICH, E. Merocyanine 540 as a Fluorescent Probe of Membranes: Staining of Electrically Excitable Cells. **Cell**, v.13, p.475-486. 1978.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. **Journal Histochemic Cytochemic**. v.30, p.279–280, 1982.

FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion sperm. **Molecular Reproductive and Development**. v.32, p. 23–27, 1992.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology and Reproduction** v.57,p.1401–1406,1997.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A. Viability assessment of mamalian sperm using SYBR-14 and Propidium iodide. **Biology and Reproduction**. v.53, p.276-284, 1995.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology and Reproduction**. v.57, p.1401–6, 1997.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, p.445-457, 2005.

GRAHAM, E.F.; SCHMEHL, M.K.L.; NELSON, D.S. Problems with laboratory assays. **Proceedings of the 8th Technical Conference on Artificial** p.59–66 1980.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**. v.68, p.239-247, 2001.

GRAHAM, J.K., KUNZE, E., HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology Reproduction**. v. 43, p. 55–64, 1990.

GREEN, C.E.; WATSON, P.F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v.122, p.889–898, 2001.

HILLERY, F.L.; PARRISH, J.J.; FIRST, N.L. Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. **Theriogenology**, v.33, p.249, 1990.

JOHANNISSON, A.; MORRELL, J.M.; THORÉN, J.; JONSSON, M.; DALIN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Colloidal centrifugation with Androcoll-E prolongs stallion sperm motility, via viability and chromatin integrity. **Animal Reproduction Science**. v.116, p.119–28. 2009.

KEEL, B.A.; SCHALUE, T.K. Correlation of the bovine cervical mucus penetration test with human sperm characteristics in 1406 ejaculates. **Archive of Andrology**. v. 44, p. 109–115, 2000.

LANGNER, M.; HUI, S.W. Merocyanine interaction with phosphatidylcholine bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1149, p.175–179. 1993.

MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. Evaluation of bull sêmen fertility by homologous in vitro fertilization tests. **Reproduction Nutrition Development**,, v.30, p.259-266, 1990.

MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. Evaluation of bull sêmen fertility by homologous in vitro fertilization tests. **Reproduction Nutrition Development**, v.30, p.259-266,

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, p.71-78, 1999.

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v.72, p.179–189. 2009.

MEYERS, S.A.; OVERSTREET, J.A.; LIU, I.K.M.; DROBNIS, E.Z. Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reaction in fertile and subfertile mares. **Journal Andrology**. v.16, p. 47–54, 1995.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.104-118, 2008.

MORRELL, J.M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A.M; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density gradient and single layer centrifugation through silica colloids. **Reproduction in Domestic Animals**. V.44, p.512–7. 2009.

MORRELL, J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. **Veterinary Medicine International** 2011, doi:10.4061/2011/2984767.

MORRELL, J.M.; STUHTMANN, G.; MEURLING, S.; LUNDGREN, A.; WINBLAD, C.; MACIAS GARCIA, B.; JOHANNISSON, A. Sperm yield after single layer centrifugation with Androcoll-E is related to the potential fertility of the original ejaculate . **Theriogenology**, v 81, p.1005 –1011. 2014.

MOUSTAFA, M.H.; SHARMA, R.K.; THORNTON, J.; MASCHA, E.; ABDEL-HAFEZ, M.A.; THOMAS, A.J.J.; AGARWAL, A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. **Human Reproduction**, v.19, p.129–138. 2004.

NEIL, D.M.; GADELLA, B.M.; CHAVES, M.G.; MIRAGAY, M.H.; COLENBRANDE, B. R.; AGÜERO, A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation **Theriogenology**, v.59, p.1693–1705, 2003. O’FLAHERTY, C; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. **Free Radical Biology & Medicine** v.41, p528–540. 2006.

OLDS-CLARKE P. How does poor motility alter sperm fertilizing ability? **Journal of Andrology** v.17, p.183-186, 1996.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; DE ANDRADE, A.F.C.; SANTOS, R.M.; BELETTI, M.E.; PERES, R.F.G.; MARTINS, J.P.N.; HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M. Effect of sequence of insemination after simultaneous thawing of multiple semen straws on conception rate to timed AI in suckled multiparous Nelore cows. **Theriogenology**, v.78, p.1800-1813, 2012.

PARTYKA, A.; NIŻAŃSKI, W.; OCHOTA, M. Methods of Assessment of Cryopreserved Semen. In: KATKOV, I. (Ed.). **Current Frontiers in Cryobiology**,

Rijeka, Croácia, 2012. cap. 20, p.547-574. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryobiology/methods-of-assessment-of-cryopreserved-semen>>. Acesso em 05 de janeiro de 2015.

PAYAN-CARREIRA, R.; BORGES, P.; MIR, F.; FONTBONNE, A. Molecular Markers in Sperm Analysis. In: LEMMA, A. (Ed.). **Success in Artificial Insemination – Quality of Semen and Diagnostics Employed**. Rijeka, Croácia, 2013. cap. 6, p.93-115. Disponível em: < <http://intechopen.com/books/success-in-artificial-insemination-quality-of-semen-and-diagnostics-employed/molecular-markers-in-sperm-analysis>>. Acesso em 05 de janeiro de 2015.

PERIS, S.I., BILODEAU, J.F.; DUFOUR, M.; BAILEY, .JL. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on dna integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction and Development** v.74, p.878–892. 2007

PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. **Theriogenology**, v.44, p.915–923, 1995.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v.36, p.77-86, 1994.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. State of the art in farm animal sperm evaluation. **Reproduction Fertility and Development** v.9, p.91-101. 2007.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; ZHANG, B.R.; SÖDERQUIST, L. In vitro assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**. v43, p.1–11.1997.

SAACKE, R.G.; NADIR, S.; DALTON, J.C.; BAME, J.H.; DEJARNETTE, J.M.; DEGELOS, S.; NEBEL, R.L. Accessory sperm evaluation and bull fertility: an update. In: Technique Conference on Artificial Insemination and Reproduction. **National Association of Animal Breeders**, Columbia, MO, USA.: NAAB,. v.15, p.57-67, 1994
SHEN, H. e ONG ,C. Detection of oxidative dna damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. **Free Radical Biology & Medicine** 28 529–536. 2000.

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARAES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA M.V.G.B.; SILVEIRA, T. S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. **Revista Brasileira de Zootecnia**., v.36, p.387-395, 2007

SUDANO, M. J.; CRESPILO, A. M.; FERNANDES, C. B.; MARTINS JUNIOR, A.; PAPA, F. O.; RODRIGUES, J.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F. da C. Use of Bayesian Inference to Correlate In Vitro Embryo Production and In Vivo Fertility in Zebu Bulls. **Veterinary Medicine International**, p.1-6, 2011

SUGULLE, A.H.; BHUIYAN, M.M.U.; SHAMSUDDIN, M. Breeding soundness of bulls and the quality of their frozen sêmen used in cattle artificial insemination in Bangladesh. **Livestock Research for Rural Development**, v.18, p.54,2006

SWANSON, E.W.; BEARDEN, H.J. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.10, p.981-987, 1951.

TARDIF, S.; LAFOREST, J.-P.; CORMIER, N.; BAILEY, J.L. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. **Theriogenology**, v. 52, p. 447–458, 1999.

TAŞ, M.; BACINOGLU, S.; CIRIT, U.; OZDAŞ, Ö.B.; AK, K. Relationship between bovine fertility and the number of spermatozoa penetrating the cervical mucus within straws. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 18–27, 2007.

THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Effect of Cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow Cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 786–93, 1998.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas – SAEG. Viçosa, MG: 2007. (CD-ROM).

VASCONCELOS, J.L.M; JARDINA, D.T.G.; SÁ FILHO, O.G.; ARAGONB, F.L.; VERAS, M.B. Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropin releasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.75, p.1153–1160. 2011.

VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, A.; DEPAUW, I.; DEWULF, J.; DEKRUIF, A. Migration of bovine spermatozoa in synthetic medium and its relation to in vivo bull fertility. **Theriogenology**, V.58, P.1027–1037, 2002.

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

VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; BAME, J.H.; DeJARNETTE, J.M.; MCGILLIARD, M.L. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3827-3835, 1991.

WANG, X.; SHARMA, R.K.; SIKKA, S.C.; THOMAS, A.J.J.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. **Fertility and Sterility**, v.80, p.531–535, 2003.

WEI, H.; FUKUI, Y. Effects of bull, sperm type and sperm pretreatment on male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.11, p.59-65, 1999.

WILHELM, K.M.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Comparison of the Fertility of Cryopreserved Stallion Spermatozoa with Sperm Motion Analyses, Flow Cytometric Evaluation, and Zona-Free Hamster Oocyte Penetration. **Theriogenology**, v.46, p.559-578, 1996.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M.G.H.; RODRIGUEZMARTINEZ, H. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. **International Journal of Andrology**, v.22, p.253–260, 1999.

FULLER, S.J.; WHITTINGHAM, D.G. Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development. **Journal Reproduction and Fertility**, v.108, p.139-145, 1996.

CORMIER, N.; SIRARD, M.A.; BAILEY, J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of Andrology**, v.18, p461-468, 1997.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p.481-487, 1997.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Chlorotetracycline analysis of foar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p.408-418, 1997.

ANDRADE, A. F. C. **Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em espermatozoides criopreservados de eqüinos.** 2009. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-21122010-075539/>>. Acesso em: 2016-01-29.

ANEXO

DILUIÇÕES E PREPAROS DAS SONDAS UTILIZADAS NA CITOMETRIA DE LFUXO

1. Iodeto de Propídeo (IP)

Solução estoque (25 mg/mL = 40 mM)

25 mg PI + 1 mL DMSO

Solução de trabalho (0,5 mg/mL = 0,8 mM)

20 uL SE + 980 uL PBS

2. FITC-PSA

Solução estoque (0,5 mg/mL)

2 mg FITC-PSA + 4 mL PBS

Solução de trabalho (100 ug/mL)

2 mg FITC-PSA + 20 mL PBS

3. JC-1

Solução estoque (1,53 mM)

5 mg JC1 + 5 mL DMSO

Solução de trabalho (153 uM)

100 uL SE + 900 uL DMSO

4. DCFDA

Solução estoque I (50 mg/mL)

1 g DCFDA + 20 mL DMSO

Solução estoque II (5 mg/mL)

1 mL SE I + 9 mL DMSO

Solução de trabalho (1 mg/mL)

1 mL ST I + 4 mL DMSO

5. MEROCIANINA

Solução estoque (1 mg/mL)

1 mg MERO + 1 mL DMSO

Solução de trabalho (0,5 mg/mL)

1 mL SE + 1 mL DMSO