

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS SÃO LUÍS DE MONTES BELOS, GO
PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO RURAL SUSTENTÁVEL
MESTRADO PROFISSIONAL

JAQUELINE FERREIRA DANIEL SANTOS

**QUALIDADE DO SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES ESPERMÁTICAS**

São Luís de Montes Belos
2019

JAQUELINE FERREIRA DANIEL SANTOS

**QUALIDADE DO SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES ESPERMÁTICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Goiás Câmpus São Luís de Montes Belos para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento Rural Sustentável.

Linha de pesquisa: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Klayto José Gonçalves dos Santos

São Luís de Montes Belos
2019

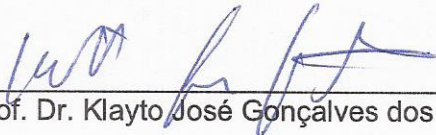
JACQUELINE FERREIRA DANIEL SANTOS

**QUALIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
ESPERMÁTICAS**

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual de Goiás - Câmpus São Luís de
Montes Belos, para a obtenção do título de
Mestra em Desenvolvimento Rural Sustentável.

Aprovado em: 28 de Março de 2019.

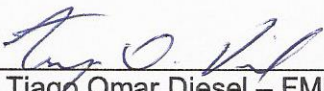
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Klayto José Gonçalves dos Santos – UEG



Prof. Dr. Rafael Alves Costa Ferro – UEG



Prof. Dr. Tiago Omar Diesel – FMB

Dedico este trabalho a minha mãe,
Maria Regina Ferreira Donato
Que agora está brilhando no céu!

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Adonai, meu Criador, meu Senhor e meu Salvador Jesus Cristo.
Obrigado meu Abba!!!

Ao meu marido Rogério Alves dos Santos Ferreira, meu melhor amigo e meu coração, que me incentivou e apoiou em realizar esse Mestrado. Amo você!!!

A minha família, em especial meus irmãos Rackel Carvalho Donato e Virgolino Donato Daniel Junior; e meus avós Sebastião Evangelista Ferreira e Áurea Carvalho Ferreira; e minha tia Ana Maria Ferreira, pelo amor e cuidados. Amo vocês!!!

A Universidade Estadual de Goiás Câmpus São Luís de Montes Belos pela oportunidade de participar do programa de Pós-graduação Mestrado Profissional em Desenvolvimento Rural e Sustentável.

Ao meu orientador o professor Dr. Klayto José Gonçalves dos Santos pela orientação durante a realização de todo esse trabalho.

Aos professores do programa de Mestrado da Universidade Estadual de Goiás, Câmpus São Luís de Montes Belos pelos ensinamentos acadêmicos e profissionais.

Aos funcionários da Universidade Estadual de Goiás, Câmpus São Luís de Montes Belos, que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação. Aos estagiários que me ajudaram na realização das avaliações dos animais.

A Central de bolsa de desenvolvimento institucional da Universidade Estadual de Goiás pela bolsa de estudos durante a realização do mestrado.

Aos meus amigos e colegas do Mestrado, especialmente a Camila da Silva Castro e Patrícia Fernanda Peixer; que passaram por todas as etapas comigo, nos momentos bons e ruins.

A empresa Cenube Génetica pela oportunidade de estágio, em especial ao senhor Gilmar Antônio Ferreira, a Cibele Aparecida Ferreira, a Renato Gonçalves de Andrade, a Mariluce Mazetto de Araújo e a Ivan da Silva Filho, pelo carinho e amizade.

“Ensina-nos a contar os nossos dias de tal maneira que alcancemos corações sábios”.

Salmos 90:12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação da motilidade (%) do sêmen bovino em diferentes concentrações espermáticas.....	43
Tabela 2	Avaliação das patologias do sêmen bovino criopreservado em diferentes concentrações espermáticas.....	46
Tabela 3	Avaliação dos parâmetros de deslocamento do sêmen bovino criopreservado em diferentes concentrações espermáticas (média $\pm$ desvio padrão).....	49
Tabela 4	Avaliação das velocidades de deslocamento dos espermatozoides em diferentes concentrações espermáticas.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Espermatozoide bovino.....	17
Figura 2	Principais defeitos dos espermatozoides	23

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Correlação entre a concentração espermática e o número de espermatozoides normal do sêmen bovino criopreservado.....	52
Gráfico 2	Correlação entre a concentração espermática e o número de espermatozoides com defeito de DMR do sêmen bovino criopreservado.....	53
Gráfico 3	Correlação entre a concentração espermática e o número de espermatozoides com defeitos de cabeça do sêmen bovino criopreservado.....	54
Gráfico 4	Correlação entre a concentração espermática e a motilidade no descongelamento do sêmen bovino criopreservado.....	55
Gráfico 5	Correlação entre a concentração espermática e o TTR/R do sêmen bovino criopreservado.....	56
Gráfico 6	Correlação entre a concentração espermática e o TTR/L do sêmen bovino criopreservado.....	56
Gráfico 7	Correlação entre a concentração espermática e a BCF do sêmen bovino criopreservado.....	57
Gráfico 8	Correlação entre a concentração espermática do sêmen bovino criopreservado e a Área de deslocamento dos espermatozoides...	58
Gráfico 9	Correlação entre a concentração espermática do sêmen bovino criopreservado e a velocidade média de deslocamento dos espermatozoides.....	58
Gráfico 10	Correlação entre a concentração espermática do sêmen bovino criopreservado e a velocidade devagar de deslocamento dos espermatozoides.....	59
Gráfico 11	Correlação entre a concentração espermática do sêmen bovino criopreservado e a velocidade estática de deslocamento dos espermatozoides.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Características e componentes químicos do sêmen bovino.....	18
Quadro 2	Classificação da propulsão e velocidade dos espermatozoides.....	25
Quadro 3	Principais estruturas analisadas do espermatozoide e as sondas fluorescentes utilizadas	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

ALH - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça

BCF - Frequência de batimento flagelar

CASA – Sistema Computadorizado de Avaliação do Movimento Espermático

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado

DMR - Reflexo Distal em Peça Intermediária

FIV – Fecundação *In vitro*

IA – Inseminação Artificial

IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo

LIN - Linearidade

mL – Mililitros

°C – Grau Celsius

pH – Potencial Hidrogeniônico

PIVE – Produção *In vitro* de Embriões

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

STR - Retilinearidade

TE – Transferência de Embriões

TTR – Teste de Termorresistência

TTR/L – Teste de Termorresistência Lento

TTR/R – Teste de Termorresistência Rápido

VAP - Velocidade média da trajetória

VCL - Velocidade curvilínea

VSL - Velocidade linear progressiva

RESUMO

A qualidade do sêmen bovino é muito importante na obtenção de bons percentuais de prenhez, pois, o uso de sêmen de má qualidade poderá prejudicar os resultados do programa de inseminação artificial, pondo a perder todos os esforços empreendidos na preparação do rebanho e os investimentos em tecnologia. Há na literatura poucos trabalhos que exploram especificamente a relação existente entre a qualidade das amostras seminais dos touros e a concentração ideal de espermatozoides viáveis inseminados e sua influência sobre a fertilidade. O objetivo foi avaliar o efeito da concentração espermática na cinética e morfologia espermática do sêmen bovino criopreservado em diferentes concentrações espermáticas. As concentrações espermáticas avaliadas foram 10×10^6 , 20×10^6 , 30×10^6 , 40×10^6 e 50×10^6 de espermatozoides por palheta do mesmo ejaculado. As doses descongeladas para análise tiveram seus espermatozoides submetidos aos testes do CASA de cinética e morfologia espermática, ao teste de termorresistência lento (TTR/L) e de termorresistência rápido (TTR/R). A análise estatística foi realizada pelo programa SISVAR[®] $p < 0,05$ e foram utilizados o teste Tukey e o teste de Correlação. As concentrações espermáticas de 30×10^6 e 40×10^6 de espermatozoides por palheta são as que apresentaram melhor qualidade espermática.

Palavras-chave: CASA. Dose inseminante. Termorresistência. Touros.

ABSTRACT

The quality of bovine semen is very important in achieving good pregnancy percentages, as the use of poor semen can harm the results of the artificial insemination program, thus losing all the efforts made in the preparation of the herd and investments in technology. There are few studies in the literature that specifically explore the relationship between the quality of the seminal samples of the bulls and the ideal concentration of viable spermatozoa inseminated and their influence on fertility. The objective was to evaluate the effect of sperm concentration on sperm kinetics and morphology of cryopreserved bovine semen at different sperm concentrations. The concentrations of sperm evaluated were 10×10^6 , 20×10^6 , 30×10^6 , 40×10^6 and 50×10^6 spermatozoa per vial of the same ejaculate. The thawed doses for analysis had their spermatozoa submitted to CASA tests of kinetics and sperm morphology, slow thermoresistance test (TTR/L) and fast thermoresistance (TTR/R) test. Statistical analysis was performed using the SISVAR[®] program $p < 0,05$ and the Tukey test and the Correlation test were used. The spermatoc concentrations of 30×10^6 and 40×10^6 of spermatozoa per vane were those that presented better spermatoc quality.

Key words: Bulls. CASA. Dose inseminate. Thermoresistance.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1– CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2. 1 Sêmen bovino	16
2. 2 Criopreservação do sêmen bovino.....	19
2. 3 Qualidade do sêmen bovino criopreservado.....	22
2. 4 Métodos de avaliação da qualidade do sêmen bovino	23
2. 4. 1 Avaliação macroscópica do sêmen bovino.....	24
2. 4. 2 Avaliação microscópica do sêmen bovino	25
2. 4. 3 Análise das patologias do sêmen bovino.....	25
2. 4. 4 Teste de termorresistência	26
2. 4. 5 Sistema computadorizado de avaliação do movimento espermático	26
2. 4. 6 Citometria de fluxo.....	28
REFERÊNCIAS.....	30
CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1	36
RESUMO.....	36
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO	37
METODOLOGIA	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	60
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Com destaque no cenário mundial do agronegócio a pecuária, atividade presente em todos os estados brasileiros é um setor de grande importância econômica. Nesse segmento se destaca a bovinocultura, ramificada em cadeia produtiva da carne e do leite. Os bons resultados quantitativos e qualitativos alcançados na produção de bovinos estão diretamente ligados ao clima tropical, à extensão territorial, ao uso de tecnologias, a capacitação profissional, a sanidade animal, o manejo reprodutivo animal, a nutrição animal e a segurança alimentar.

A importância do uso de tecnologias na bovinocultura brasileira vem sendo reconhecida, principalmente pela perspectiva de retorno financeiro por meio da eficiência nos sistemas de produção, intensificada com o uso de eficientes técnicas de manejo e biotecnologias aplicadas à reprodução animal. Proporcionando assim, o aumento da produtividade do setor pecuário, produzindo com sustentabilidade e competitividade, pela otimização do sistema de produção, através de maior produtividade por área, diminuição dos custos e maximização do uso de animais geneticamente superiores (EMERICK et al., 2011).

A avaliação e a seleção de animais são extremamente importantes no Brasil, devido ao enorme déficit de reprodutores geneticamente qualificados para atender à demanda dos pecuaristas, necessitando de cerca de 350 mil touros de reposição anualmente, considerando uma relação touro:vaca de 1:30 (COSTA e SILVA et al., 2013), tem levado a ascensão da inseminação artificial (IA) e da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), isso graças a criopreservação do sêmen bovino.

A criopreservação do sêmen consiste na utilização de crioprotetores específicos que possibilitam o armazenamento das doses de sêmen, por período indeterminado em nitrogênio líquido a -196°C.

É de suma importância a qualidade do sêmen para se obter bons percentuais de prenhez, uma vez que o uso de sêmen de má qualidade poderá prejudicar os resultados de todo o programa de inseminação artificial, pondo a perder todos os esforços empreendidos na preparação do rebanho e dos investimentos em tecnologia (SEVERO, 2009).

EMERICK et al. (2011) afirmaram que devido o uso de animais geneticamente superiores a demanda de sêmen criopreservado aumentou no Brasil nas últimas décadas, tornando-se essencial para a aplicação das biotécnicas reprodutivas inseminação artificial, transferência de embriões (TE) e fertilização “*in vitro*” (FIV), eliminando as limitações de tempo e distância.

A inseminação artificial empregada nos programas de melhoramento genético de bovinos é uma eficiente forma de dispersão de genes de animais geneticamente superiores no rebanho, graças ao congelamento de sêmen, o estoque da genética de importância para o rebanho e sua utilização em estações de monta, facilitando o manejo dos animais na fazenda (ABUD et al., 2014). Entretanto, apresenta como fator limitante de sua eficiência, o processo de criopreservação dos espermatozoides e a avaliação da sua viabilidade celular.

Os procedimentos de separação espermática permitem a recuperação de espermatozoides de melhor qualidade, exibindo maior proporção de movimento progressivo e de células morfolologicamente normais, técnica extremamente importante considerando que um touro pode produzir até 500 doses de sêmen por ejaculado (DIAS et al., 2012).

O objetivo da realização do trabalho foi descrever a importância da qualidade do sêmen bovino criopreservado, através da elevação da fertilidade dos rebanhos, buscando aumentar a eficiência econômica da bovinocultura brasileira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2. 1 Sêmen bovino

Os espermatozoides são células alongadas, recobertos pela membrana plasmática e são constituídos de uma cabeça que contém o núcleo e de uma cauda (flagelo) para motilidade celular. Eles desempenham um papel fundamental na fecundação devido ao DNA contido em seu núcleo (GARCIA e FERNÁNDEZ, 2001).

Na cabeça estão o núcleo e o acrossoma. O colo conecta a cabeça com o flagelo, que é dividido em peça intermediária, principal e terminal (GARNER e HAFEZ, 2004). Essas partes que compõem um espermatozoide bovino estão apresentadas na Figura 1.

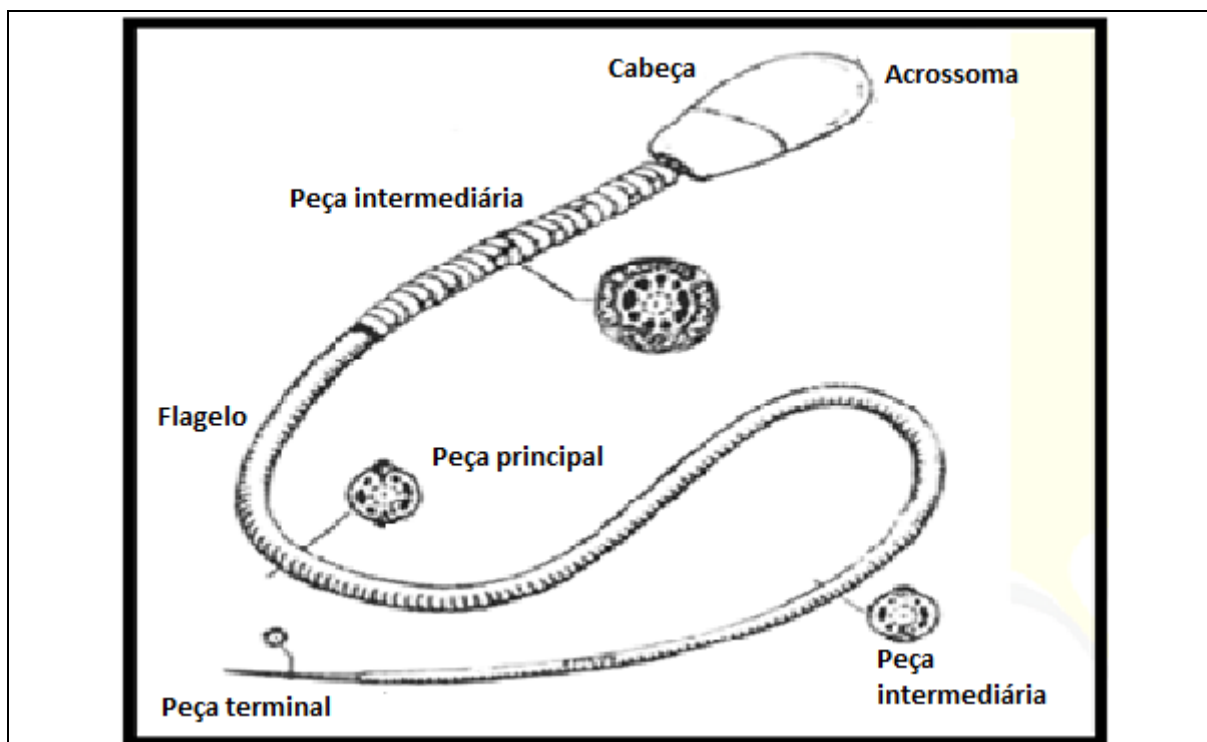


Figura 1: Espermatozoide bovino.

Fonte: Adaptado GARNER e HAFEZ (2004).

A produção de espermatozoides é um processo contínuo, eles são produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos e então transportados através dos testículos para o epidídimo, onde são armazenados e maturados (REECE, 2014). Após a maturação os espermatozoides estão prontos para serem liberados na ejaculação.

A cauda do epidídimo dos touros possui uma capacidade de armazenamento de até dez ejaculados sucessivos, onde os espermatozoides conseguem sobreviver por até 15 dias, entretanto após a ejaculação eles sobrevivem pouco mais de 24 horas (BARBOSA et al., 2012).

Segundo GARNER e HAFEZ (2004) o sêmen é definido como a suspensão celular líquida que contém os espermatozoides e as secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino, formando no momento da ejaculação o plasma seminal. As características e os componentes químicos do sêmen bovino podem ser observados abaixo na Quadro 1.

Quadro 1: Características e componentes químicos do sêmen bovino.

Característica do Componente	Touro
Volume do ejaculado (mL)	5-8
Concentração espermática (milhões/mL)	800-2000
Espermatozoides por ejaculado (bilhões)	5-15
Espermatozoides móveis (%)	40-75
Espermatozoides morfolologicamente normais (%)	65-95
Proteínas (g/100mL)	6,8
pH	6,4-7,8
Frutose (mg/100mL $\pm$ S.E.)	460-600
Sorbitol (mg/100mL $\pm$ S.E.)	10-140
Ácido cítrico (mg/100mL $\pm$ S.E.)	620-806
Inositol (mg/100mL $\pm$ S.E.)	25-46
Glicerilfosforilcolina (GPC) (mg/100mL $\pm$ S.E.)	100-500
Ergotioneína (mg/100mL $\pm$ S.E.)	0
Sódio (mg/100mL $\pm$ S.E.)	225 $\pm$ 13
Potássio (mg/100mL $\pm$ S.E.)	155 $\pm$ 6
Cálcio (mg/100mL $\pm$ S.E.)	40 $\pm$ 2
Magnésio (mg/100mL $\pm$ S.E.)	8 $\pm$ 0,3
Cloreto (mg/100mL $\pm$ S.E.)	174 $\pm$ 320

Fonte: Adaptado HAFEZ e HAFEZ (2004).

O sêmen liberado na ejaculação do touro é constituído por 10% de espermatozoides e líquido do canal deferente, cerca de 60% de líquido das vesículas seminais, 30% de líquido próstatico e uma pequena quantidade de líquido das glândulas bulbouretais (GUYTON e HALL, 2002).

Composto por íons, açúcares, proteínas, lipídeos, aminoácidos, ácido cítrico, minerais, fosfatases, prostaglandinas, potássio e citrato; o plasma seminal fornece condições favoráveis de sobrevivência aos espermatozoides (REECE, 2014). Constituído por vários tipos de açúcares como a frutose (principal açúcar do plasma seminal de touros), glicose, manose, galactose, arabinose, ribose, fucose, sorbitol e inositol; fornecendo substratos para produção de energia aos espermatozoides, sendo diretamente relacionadas com a fertilidade (ASSUMPÇÃO et al., 2013 b).

O volume do plasma seminal pode variar de acordo com a espécie e o sêmen pode ser diluído em taxas específicas garantindo que o volume da dose inseminante contenha espermatozoides suficientes para proporcionar alta fertilidade sem desperdiçar muitas células (HAFEZ, 2004).

2. 2 Criopreservação do sêmen bovino

Para iniciar a coleta de sêmen e obter bons ejaculados que possam ser congelados alguns cuidados referentes ao touro devem ser tomados. O sêmen bovino pode ser coletado por diferentes métodos levando em consideração o bem estar dos animais, um bom manejo e pessoas bem preparadas. Esses métodos utilizados são a eletroejaculação, a vagina artificial e a massagem das ampolas dos ductos deferentes (CARVALHO, 2014).

A criopreservação possibilita o armazenamento de células espermáticas por um longo prazo (BOSCARATO e MARTINS, 2014), e esse material genético pode ser utilizado nos programas de IA e IATF, e também na produção *in vitro* de embriões (PIVE).

A criopreservação de gametas traz inúmeras vantagens para a produção e reprodução de diversas espécies animais, por isso vários métodos são empregados para avaliar a conservação seminal entre elas a motilidade, as morfolopatologias, a morfometria e a fertilização (ARAÚJO, 2010).

A célula espermática durante o processo de criopreservação é submetida a estresse mecânico, químico, osmótico e térmico entre 5°C e -158°C (FUJITA et al., 2013); gerando danos à membrana celular pela desestabilização da bicamada lipídica, que ocorre à medida que a temperatura diminui e a membrana sofre uma transição de fase, passando da fase fluída para a fase de gel (BOSCARATO et al., 2016).

Os métodos de criopreservação de espermatozoides são relacionados com a estrutura funcional das membranas espermáticas e metabolismo celular, através da diluição, refrigeração, congelação, armazenamento e descongelação do sêmen (LUZ et al., 2011) e constituído de vários passos não fisiológicos, envolvendo o uso de um agente crioprotetor permeável, o resfriamento, o aquecimento e a remoção desse crioprotetor (ABUD et al., 2014).

O sucesso da congelação espermática está sujeito ao bloqueio completo de todos os processos metabólicos das células espermáticas. Foi a partir da década de 40 que a criopreservação do sêmen bovino teve grandes avanços decorrentes da descoberta da função crioprotetora do glicerol, entretanto, a preservação média da viabilidade espermática é de apenas cerca de 50% (CHACUR et al., 2012; GUERRA NETO et al., 2012). Esse baixo índice é resultado das diversas alterações bioquímicas e estruturais da célula espermática (acrossomo, núcleo, mitocôndrias, axonema, membrana plasmática) e até 85% dos espermatozoides bovinos sofrem algum tipo de injúria durante o processo de congelação/descongelação (CRESPILO, 2007; BOSCARATO e MARTINS, 2014).

A primeira etapa da criopreservação espermática é a diluição do sêmen em meios específicos para garantia da manutenção do movimento celular (PAPA et al., 2008). Sua composição influencia na sobrevivência espermática durante o processamento e na refrigeração ou congelação (CRESPILO, 2007), fator crucial para a preservação da integridade espermática e habilidade de fertilização dos espermatozoides bovinos (PRADO et al., 2012).

O sêmen diluído é envasado em palhetas francesas de 0,25mL ou de 0,5 mL de forma manual, por meio de pipetas e/ou seringas ou automática, com envasador próprio para palheta (BERBER, 2009). O congelamento das palhetas de sêmen pode ser realizado através de sistema automatizado, onde a curva de resfriamento é controlada eletronicamente ou pelo sistema convencional em que a curva de resfriamento não é controlada (ABUD et al., 2014). Após o congelamento as palhetas são acondicionadas em hastes metálicas chamadas de raques e são armazenadas nos botijões de nitrogênio líquido (TEIXEIRA, 2009).

A função dos agentes crioprotetores é proporcionar nutrientes como fonte de energia; proteger contra o efeito prejudicial do resfriamento rápido; evitar variações de pH à medida que o ácido láctico é formado; manter a pressão osmótica e o equilíbrio eletrolítico; inibir o crescimento bacteriano; aumentar o volume do sêmen e proteger os espermatozoides durante a congelação (HAFEZ, 2004).

Os diluentes são substâncias iônicas e não-iônicas que mantêm a osmolaridade e tamponam o meio; são compostos por um crioprotetor, uma fonte de lipoproteína e aditivos (LEITE et al., 2011; BERTOL et al., 2014). Os principais crioprotetores bovinos são os açúcares: o glicerol, o etilenoglicol e o dimetilsulfóxido (DMSO) (MADEIRA et al., 2013; BERTOL et al., 2014). Como fonte de lipoproteína

para proteger contra o choque térmico são usados a gema de ovo (FUJITA et al., 2013; MADEIRA et al., 2013), o leite de vaca integral homogeneizado, o leite desnatado fresco ou reconstituído, a água de coco e a lecitina de soja (LEITE et al., 2011). Os aditivos empregados na criopreservação são as enzimas antioxidantes e os antibióticos (LEITE et al., 2011; BERTOL et al., 2014).

A concentração espermática da dose inseminante é relacionada como um dos fatores que interferem na fertilidade do sêmen congelado (DIAS, 2010), o processo de diluição do sêmen contribui para o aproveitamento de um ejaculado para um maior número de fêmeas (CAVALERO et al., 2015), uma vez que os bovinos produzem ejaculados contendo uma maior quantidade de espermatozoides do que o necessário para a fecundação (ARAÚJO, 2010).

A diluição excessiva causa desestabilização da membrana devido à diminuição de fatores protetores do plasma seminal, que interferem na fertilidade pós-inseminação. Entretanto, em doses de sêmen com altas concentrações espermáticas, um dos problemas encontrados é o estresse oxidativo, onde o metabolismo dos espermatozoides gera grande quantidade de radicais livres (superóxido) e o não radical (peróxido de hidrogênio) (DUARTE JUNIOR et al., 2015; QUEIROZ et al., 2015).

As doses de sêmen comercializadas no Brasil utilizadas para inseminação artificial são padronizadas para os touros de alta fertilidade em 10×10^6 de espermatozoides e de até 15×10^6 de espermatozoides móveis por dose para os touros de fertilidade média a baixa (SEVERO, 2009). Porém, esse número representa apenas número de espermatozoides inseminados e não a porcentagem referente à fertilidade.

Existe a necessidade de obter informações mais objetivas acerca da porcentagem de espermatozoides móveis, pois esses dados precisos sobre o movimento espermático pode ser utilizada para prever o potencial de fertilidade ou selecionar o melhor procedimento para o processamento do sêmen (NASCIMENTO et al., 2015).

CRESPILHO (2007) considera que o número mínimo de espermatozoides necessários à elevação dos índices de concepção bovina é motivo para novas pesquisas e trabalhos, afinal determinar qual a melhor dose inseminante, reflete numa melhor relação custo/benefício, garante bons índices de fertilidade e controla a variação individual dos touros.

2. 3 Qualidade do sêmen bovino criopreservado

A qualidade do sêmen bovino corresponde ao conceito sobre o seu poder fecundante e sua relação com a fertilidade, onde o sêmen é congelado e depois descongelado para avaliação da qualidade dos espermatozoides (SEVERO, 2009).

O critério na avaliação da fertilidade seminal após o descongelamento é a taxa de espermatozoides móveis e que o critério para o sucesso da reprodução é a duração da motilidade espermática, que é inferior a um minuto, mas, muito importante para a fertilização (CELEGHINI et al., 2017), já que os espermatozoides precisam encontrar e penetrar a micrópila do ovócito antes do seu fechamento (DIAS, 2010).

Os touros selecionados para os centros de coleta e armazenamento do sêmen, considerados geneticamente superiores são escolhidos de acordo com suas características fenotípicas e genotípicas, e com a utilização da seleção genômica, o que possibilita a inclusão de animais jovens nos programas, sem a realização de testes de fertilidade a campo (CARREIRA, 2012). Por isso a avaliação da qualidade do ejaculado desses touros é de grande importância, bem como o conhecimento da fertilidade e qualidade do sêmen após o congelamento.

A qualidade do sêmen bovino sofre uma influência da idade ocasionada pela maturidade sexual, que ocorre entre 30 e 36 meses de idade nos *Bos taurus indicus* e entre 16 e 20 meses nos *Bos taurus taurus* (MELLO, 2014), além disso fatores ambientais, nutricionais, a raça e a idade do touro podem influenciar na qualidade do ejaculado (QUEIROZ et al., 2015).

Com a maturidade sexual do touro, a avaliação de sua fertilidade é baseada nas características do animal e do seu sêmen (ASSUMPÇÃO et al., 2013 a), que deve apresentar no mínimo 50% de motilidade espermática progressiva e morfologia espermática com no máximo 10% de defeitos espermáticos maiores e 20% de defeitos espermáticos menores (MONTEIRO et al., 2011; ASSUMPÇÃO et al., 2013 a; ARRUDA et al., 2015); conforme mostra a Figura 2.



Figura 2: Principais defeitos dos espermatozoides.

Fonte: MARQUES e MENDES, 2017.

A motilidade característica observada na avaliação da qualidade espermática após o processo de criopreservação (CARVALHO et al., 2009; CHACUR et al., 2012), vem sendo substituída pelo Sistema Computadorizado de Avaliação do Movimento Espermático (CASA), que é capaz de avaliar células móveis, imóveis e registra suas trajetórias individuais e as características do movimento (CHACUR et al., 2012; CARREIRA, 2012).

2. 4 Métodos de avaliação da qualidade do sêmen bovino

A qualidade do sêmen está amarrada a integridade e função de todas as estruturas que constituem o espermatozoide, como a membrana plasmática, o flagelo, as mitocôndrias, o acrossomo e a cromatina, que geralmente são avaliadas separadamente por diferentes técnicas e nem sempre correspondem à sua capacidade fecundante (ARRUDA et al., 2011).

Segundo SEVERO (2009) o sucesso na fertilização é resultado da correta manipulação do sêmen, da qualidade dos espermatozoides (características físicas e morfológicas adequadas) e de inseminadores capacitados e qualificados.

A correlação entre os parâmetros espermáticos e os índices de fertilidade ainda são variáveis, apesar do desenvolvimento de vários métodos de análise laboratorial do sêmen bovino congelado, todavia, nenhuma técnica de avaliação executada isoladamente apresenta sensibilidade suficiente para determinar a

fertilidade, mas sim, a combinação dos diversos métodos de análises (LIMA 2014; CELEGHINI et al., 2017).

Na avaliação da fertilidade do touro a análise do sêmen é muito importante e pode ser realizada por diferentes métodos, entre eles a avaliação macroscópica, microscópica e análise das patologias espermáticas (TEIXEIRA, 2009); o Teste de Termorresistência (SIQUEIRA et al., 2007); e as avaliações do Sistema Computadorizado de Avaliação do Movimento Espermático (CASA) e do Citômetro (GUERRA NETO et al., 2012).

2. 4. 1 Avaliação macroscópica do sêmen bovino

A análise macroscópica compreende a verificação do volume, coloração, odor, movimento de massa, densidade e pH do ejaculado (TEIXEIRA, 2009; OLIVEIRA et al., 2011; MIRANDA NETO et al., 2011).

- A verificação do volume avalia a qualidade espermática e determina o número de doses de sêmen que serão preparadas. O volume do ejaculado bovino varia de 0,5 – 20 mL, mas em geral a média é 5 mL (TEIXEIRA, 2009).
- A coloração do sêmen bovino é classificada como branca ou branco-perolado (MIRANDA NETO et al., 2011).
- O odor do sêmen bovino na maioria das vezes é característico (*sui generis*) que provém do fosfato de espermina, mas pode apresentar um odor urinoso ou cítrico pela presença de urina no ejaculado (TEIXEIRA, 2009).
- O movimento de massa do sêmen consiste na visualização da movimentação do ejaculado. Em touros é difícil de ser observado e pode ser classificado em movimento ativo, médio ou lento (MARQUES FILHO, 2008).
- O pH do sêmen do touro varia entre 6,5 a 6,9 (TEIXEIRA, 2009).
- A densidade do sêmen representa a quantidade de células espermáticas, que pode variar de um animal para outro e entre os ejaculados do mesmo touro; e é classificada em muito densa; densa; pouco densa; aquosa (OLIVEIRA et al., 2011).

2. 4. 2 Avaliação microscópica do sêmen bovino

A avaliação física microscópica do sêmen é realizada em microscópio óptico e são avaliadas a concentração, a motilidade, o turbilhonamento e o vigor (OLIVEIRA et al., 2011; MIRANDA NETO et al., 2011).

Para avaliar a concentração são utilizados a Câmara de Neubauer e/ou Espectrofotômetro, que determinam o número de espermatozoides por centímetro cúbico (TEIXEIRA, 2009).

A motilidade é avaliada imediatamente após a coleta de sêmen, representa a porcentagem de espermatozoides vivos e móveis; e indicam a intensidade de deslocamento dos espermatozoides (BERBER, 2009).

O turbilhonamento é o movimento dos espermatozoides identificado em forma de ondas na observação de uma pequena gota de sêmen no microscópio ou na observação do ejaculado contra a luz; e é classificado numa escala de 0 a 5 (TEIXEIRA, 2009).

O vigor é avaliado na mesma lâmina da motilidade, observando a propulsão e a velocidade dos espermatozoides na lâmina, e classificando-os em graus de 0 a 5 (Quadro 2) (OLIVEIRA et al., 2011).

Quadro 2: Classificação da propulsão e velocidade dos espermatozoides.

Grau	Propulsão e velocidade dos espermatozoides
0	Estático – morto
1	Moribundos – péssimos
2	Lento – ruim
3, 4 e 5	Bons

Fonte: Adaptado BERBER (2009).

2. 4. 3 Análise das patologias do sêmen bovino

A Análise das patologias espermáticas identifica se há alteração na cabeça, na peça intermediária e na cauda do espermatozoide. Para identificar alterações na cabeça é realizado o esfregaço de sêmen fresco em lâmina corada, o corante penetra na célula morta, mas, a viva permanece incolor e são avaliados 200 espermatozoides (TEIXEIRA, 2009).

Para avaliar alterações na peça intermediária e na cauda do espermatozoide é usado o método de câmara úmida, colocando uma gota de sêmen em formol/salina numa lâmina com lamínula vedada com esmalte e são avaliados 200 espermatozoides (SILVA et al., 2003).

2. 4. 4 Teste de termorresistência

Desenvolvido por Dimitropoulos em 1967, o Teste de Termorresistência (TTR) busca avaliar a fertilidade potencial de partidas de sêmen bovino congelado, que posteriormente foi adaptado para as demais espécies (SIQUEIRA et al., 2007).

O TTR possibilita verificar a resistência dos espermatozoides à incubação, através da avaliação da porcentagem de espermatozoides móveis na dose inseminante (BORGES-SILVA et al., 2015) o que apresenta correlação positiva e altamente significativa com a fertilidade real.

Posteriormente Dimitropoulos adaptou o Teste de Termorresistência para duas versões: o Teste de Termorresistência Lento (TTR/L) e o Teste de Termorresistência Rápido (TTR/R) (SIQUEIRA et al., 2007).

No TTR/L a prova consiste na incubação de uma amostra de sêmen à 37°C durante 5 horas, verificando a porcentagem de motilidade progressiva e o vigor dos espermatozoides a cada 30 minutos (SEVERO, 2009).

Já no TTR/R, a amostra de sêmen é colocando em banho-maria a 45°C por 30 minutos e depois avaliada a porcentagem de motilidade progressiva e o vigor dos espermatozoides (VASCONCELOS FILHO, 2010).

2. 4. 5 Sistema computadorizado de avaliação do movimento espermático

Para avaliação espermática os parâmetros mais utilizados são as características físicas como o total de espermatozoides na amostra, a motilidade espermática progressiva, o vigor, o número de espermatozoides viáveis e a morfologia espermática (defeitos maiores, menores e totais) (MARTINS et al., 2012; CELEGHINI et al., 2017). Porém, por serem considerados subjetivos, estes parâmetros têm se mostrado limitados quanto à capacidade de predizer o potencial de fertilidade do sêmen e veem sendo substituídos por outros como o Sistema

Computadorizado de Avaliação do Movimento Espermático (CASA) e o Citômetro (GUERRA NETO et al., 2012).

O método CASA é um sistema automático com hardware e software que permite a avaliação exata e objetiva da motilidade, fornece informações precisas e significativas da cinética da célula espermática, determina a porcentagem de células móveis na amostra e quantifica características específicas do movimento espermático (ARRUDA et al., 2011).

O CASA é programado com uma micrometragem mínima e máxima para identificação dos espermatozoides de acordo com a espécie animal. As imagens dos espermatozoides são capturadas pelo estroboscópico acoplado ao computador, que digitaliza as imagens, formando um vídeo do trajeto, obtido pelas marcações de pontos onde a cabeça do espermatozoide está em cada foto e eles são classificados em móvel não progressivo, linear lento, linear rápido e imóvel (BERGSTEIN et al., 2014).

Segundo Arruda et al., (2011) e Bergstein et al., (2014) os parâmetros gerados da análise espermática realizada pelo CASA são:

- Motilidade Total (%): é a proporção de células móveis total e representa à população de células em movimento com uma velocidade mínima determinada no *setup*;
- Motilidade Progressiva (%): é referente à porcentagem de células movendo-se progressivamente;
- Velocidade de Trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$): é a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula;
- Velocidade Progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$): é a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto;
- Velocidade Curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$): é a velocidade média de percurso da célula;
- Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, μm): é a largura média da oscilação da cabeça conforme a célula se move;
- Frequência de Batimentos (BCF, Hz): é a frequência com que a cabeça do espermatozoide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido;

- Retilinearidade (STR, %): é o valor médio da proporção entre VSL/VAP;
- Linearidade (LIN, %): é o valor médio da proporção entre VSL/VCL;
- Velocidade Rápida (%).

2. 4. 6 Citometria de fluxo

O uso de análises computadorizadas e sondas fluorescentes por meio de microscopia de Epifluorescência ou Citometria de Fluxo são métodos utilizados em diversas espécies, devido a sua maior acurácia sobre a qualidade do sêmen (NASCIMENTO et al., 2015).

As amostras coradas pelas sondas fluorescentes são avaliadas em microscópio de fluorescência ou em Citômetro de fluxo. Esses corantes fluorescentes (Quadro 3) são sondas usadas na identificação de condições subcelulares, possibilitando a identificação de alterações estruturais ou metabólicas no interior da célula (BRAGA et al., 2016).

Quadro 3: Principais estruturas analisadas do espermatozoide e as sondas fluorescentes utilizadas.

Estrutura analisada	Sonda fluorescente
Avaliação da morfologia espermática	Rosa bengala
Avaliação da integridade da membrana plasmática	Eosina e Nigrosina
Avaliação de integridade de acrossoma	Trypan blue e Giemsa
Avaliação da integridade de DNA	Alaranjado de acridine
Teste de capacitação espermática	Hidroclorito de clortetraciclina (CTC)

Fonte: MARTINS et al., 2016.

A Citometria de Fluxo possibilita a contagem, classificação, exame e o isolamento dos espermatozoides bovinos, que são marcados com um corante fluorescente específico e movidos individualmente pelo sistema óptico do fluxo laminar para serem contados com maior repetibilidade e precisão (MAZIERO et al., 2009).

Esse feixe excita as sondas fluorescentes associadas às células e capta a frequência da luz e o equipamento converte essa frequência em sinais elétricos, que são quantificados pelo software. Por meio da Citometria de fluxo, é possível medir a quantidade de uma ou mais sondas fluorescentes associadas às células, de forma imparcial, com inigualável precisão, sensibilidade e rapidez (BERGSTEIN et al., 2014).

As sondas fluorescentes monitoram através da coloração a funcionalidade dos espermatozoides, avaliando a integridade da membrana plasmática e acrossomal, o potencial mitocondrial, a translocação de fosfolípidios de membrana, o índice de caspase-ativada, o índice de fragmentação de DNA, a integridade do flagelo, a peroxidação lipídica, a fosforilação da tirosina e a reação acrossomica (MAZIERO et al., 2009; ARRUDA et al., 2011; BERGSTEIN et al., 2014).

A Membrana plasmática é uma estrutura íntegra com funções essenciais à fecundação e a viabilidade seminal, garantindo a homeostase celular e mantendo a motilidade espermática (ARRUDA et al., 2011). A Capacitação espermática são mudanças sofridas pelo espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea, entre elas a reação acrossomal, iniciada imediatamente após a ligação do espermatozoide à zona pelúcida (BERGSTEIN et al., 2014). A relação do potencial mitocondrial e a fertilidade ainda são desconhecidas, por isso, as sondas fluorescentes usadas na identificação do potencial mitocondrial são consideradas uma boa técnica de avaliação do sêmen (BERGSTEIN et al., 2014; CELEGHINI et al., 2017). Em testes de motilidade e integridade de membrana, espermatozoides com DNA lesionados podem ser considerados normais, entretanto, eles podem induzir a uma falha no desenvolvimento embrionário (LASCARRO e SIERRA, 2013).

Técnicas de associação de sondas fluorescentes estão sendo desenvolvidas para avaliação dos espermatozoides de diferentes espécies animais e dependendo do tipo de laser, dos detectores de radiação e dos filtros presentes no Citômetro é possível avaliar múltiplos parâmetros em uma única amostra (MAZIERO et al., 2009).

REFERÊNCIAS

- ABUD, C. O. G.; ABUD, L. J.; OLIVEIRA NETO, J. C.; DODE, M. A. N.; SERENO, J. R. B.; MARTINS, C. F. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. **Ciênc. anim. bras.**, Goiânia-GO, v. 15, n. 1, p. 32-37, mar. 2014.
- ARAUJO, G. F. de. **Viabilidade da Dose Fracionada de Sêmen Bovino Criopreservado Descongelado por Diferentes Métodos**. 2010. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural da Universidade Federal do Pará. Belém-PA, Brasil.
- ARRUDA, R. P. de; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; SANTOS, G. de C. dos; LEITE, T. G.; OLIVEIRA, L. Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M. de P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte-MG, v.39, n.1, p.47-60, jan./mar. 2015.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte-MG, v.35, n.2, p.145-151, abr./jun. 2011.
- ASSUMPÇÃO, T. I. de; SOUZA, M. de A.; ALBERTON, C.; PALLAORO, R.; KITAGAWA, C.; SILVA, N. A. M. Características reprodutivas de machos bovinos da raça Nelore da fase pré-púbere à maturidade sexual. **R. bras. Ci. Vet.**, Niterói-RJ, v. 20, n. 3, p. 148-154, jul./set. 2013. (A)
- ASSUMPÇÃO, T. I. de; YONEYAMA, K. A. G.; PALLAORO, R.; KITAGAWA, C.; ALBERTON, C. Perfil de Proteínas e Açúcares do Plasma Seminal e sua Relação com os Parâmetros Andrológicos de Touros da Raça Nelore. **Biosci. J.**, Uberlândia-MG, v. 29, n. 4, p. 940-945, jul./ago. 2013. (B)
- BARBOSA, L. M.; KANAZAWA, M. Y.; PERES, A. R.; SOUZA, F. F. de. Viabilidade do sêmen congelado obtido do epidídimo de touros *post-mortem*. **R. bras. Ci. Vet.**, Niterói-RJ, v. 19, n. 3, p. 190-194, set./dez. 2012.
- BERBER, R. C. A. **Coleta e processamento de sêmen bovino**. 2009
- BERGSTEIN, T.G.; WEISS, R.R.; BICUDO, S.D. Técnicas de análise de sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte-MG, v.38, n.4, p.189-194, out./dez. 2014.
- BERTOL, M. A. F.; WEISS, R. R.; FUJITA, A. S.; KOZICKI, L. E.; ABREU, A. C. M. R. de; PEREIRA, J. F. S. Dois diluentes comerciais na criopreservação de espermatozoides do epidídimo de touros. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.44, n.9, p.1658-1663, set. 2014.

BORGES-SILVA, J. C.; SILVA, M. R.; MARINHO, D. B.; NOGUEIRA, E.; SAMPAIO, D. C.; OLIVEIRA, L. O. F.; ABREU, U. G. P.; MOURÃO, G. B.; SARTORI, R. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, Austrália, v.28, n.7, p.1004-1008, jan. 2015.

BOSCARATO, A. G.; MARTINS, L. F. Uso de colesterol na criopreservação espermática e fertilidade: uma revisão. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama-PR, v. 17, n. 2, p. 143-148, abr./jun. 2014.

BOSCARATO, A. G.; MARTINS, L. F.; PINHO, R. O.; SILVA, Y. F. R. S.; PAPA, F. O.; MACEDO, G. G. Efeito da adição de ciclodextrina carregada com colesterol sobre a qualidade do sêmen congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte-MG, v.40, n.3, p.105-110, jul./set. 2016.

BRAGA, K. M. da S.; PIMENTA, V. de S. C.; RODRIGUES, F. A.; SANTOS, T. P. dos; ARAÚJO, E. G. de. Citometria de fluxo: histórico, princípios básicos e aplicações em pesquisa. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Goiânia-GO, v.13 n.23; p. 304-319, 2016.

CARREIRA, J. T. **Qualidade espermática e danos de DNA em espermatozoides criopreservados de touros Nelore jovens, adultos e senis**. 2012. 101f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal - SP, Brasil.

CARVALHO, F. H. de. **Manejo geral de bovinos de corte, reprodução de bovinos e clínica médica de ruminantes**. 2014. 52f. TCC (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Paraná, Palotina-PR, Brasil.

CARVALHO, J. de O.; SARTORI, R.; LEMES, A. P.; MOURÃO, G. B.; DODE, M. A. N. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília-DF, v.44, n.10, p.1346-1351, out. 2009.

CAVALERO, T. S.; REIS, J. R.; JACOMINI, J. O. Morfologia espermática de touros nelore, pantaneiro e curraleiro avaliada de amostras coletadas diretamente dos testículos e dos epidídimos. **Horizonte Científico**, Uberlândia-MG, v.9, n.2, 24p. dez. 2015.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. de; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; SANTOS, F. B. dos; ALVES, M. B. R.; OLIVEIRA, B. M. M. de. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte-MG, v.41, n.1, p.40-45, jan./mar. 2017.

CHACUR, M. G. M.; DIAS, H. S. D.; PAPA, F. O.; LOUVISON, B. A.; CALESCO, M. M.; PAPA, P. de M. Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino. **Vet. e Zootec.**, Botucatu-SP, v.19, n.1, p.346-355, mar. 2012.

COSTA E SILVA, E. V.; FERREIRA, B. X.; QUEIROZ, V. L. D.; COSTA FILHO, L. C. C.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Precocidade sexual de touros a campo em condições

tropicais. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte-MG, v.37, n.2, p.97-104, abr./jun. 2013.

CRESPILHO, A. M. **Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo-fixo (IATF)**. 2007. 124f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu – SP, Brasil.

DIAS, F. E. F.; NUNES, C. M.; CAVALCANTE, T. V.; SANTOS, H. D.; MINHARRO, S.; GARCIA, J. F. PCR Multiplex fluorescente para detecção de bactérias em sêmen bovino. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro-RJ, v.32, n.3, p. 211-216, mar. 2012.

DIAS, H. S. **Efeito de meios diluentes sobre a viabilidade de sêmen congelado bovino**. 2010. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE: Presidente Prudente-SP, Brasil.

DUARTE JÚNIOR, M. F.; ZERVOUDAKIS, L. K. H.; ZERVOUDAKIS, J. T.; NICHI, M.; BERTOLLA, R. P.; TSUNEDA, P. P.; SENRA E SILVA, L. E.; WINGERT, F. M.; MARINHO, W. A. dos S. Avaliação do tocoferol no congelamento do sêmen bovino e nas taxas de prenhez após inseminação artificial em tempo fixo. **R. bras. Ci. Vet.**, Niterói-RJ, v. 22, n. 2, p. 114-118, abr./jun. 2015.

EMERICK, L. L.; DIAS, J. C.; VALE FILHO, V. R. do; SILVA, M. de A. e; ANDRADE, V. J. de; LEITE, T. G.; MARTINS, J. A. M. Avaliação da Integridade de Membrana em Espermatozoide Bovino Criopreservado para Prever o Índice de Prenhez. **Ciê. Anim. Bras.**, Goiânia-GO, v.12, n.3, p. 536-546, jul./set. 2011.

FUJITA, A. S.; WEISS, R. R.; ROSSI JUNIOR, P.; KOZICKI, L. E.; GRESELLE, F. V. N.; BERTOL, M. A. F. Taxa de Gestação em Novilhas Nelore Sincronizadas para IATF e Inseminadas com Sêmen Resfriado e Congelado. **Arch. Vet. Sci.**, Curitiba-PR, v.18, n.3, p.13-21, jul/set. 2013.

GARCIA, S. M. L. de; FERNÁNDEZ, C. G. **Espermatogênese**. In: Embriologia. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2001. Pg. 42-61.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. **Espermatozoides e Plasma Seminal**. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal. 7ª ed. Barueri - SP: Manole, 2004, cap. 7, p. 97-110.

GUERRA NETO, J. de O.; CHACUR, M. G. M.; CALDATO, F. A.; SILVA, A. A. da; CASTILHO, C. Correlação da Morfologia Espermática em Programas de Inseminação Artificial Convencional em Novilhas e Vacas da Raça Nelore. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente-SP, v. 8, n.2, p. 57-64 jul/dez. 2012.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Funções Reprodutoras e Hormonais Masculinas (e Função da Glândula Pineal)**. In: Tratado de Fisiologia Médica. 10ª ed. Rio de Janeiro – RJ: Guanabara Koogan. 2002. Cap. 80, pg. 857-868.

HAFEZ, E. S. E. **Preservação e Criopreservação de Gametas e Embriões**. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal. 7ª ed. Barueri - SP: Manole, 2004, cap. 30, p. 435-446.

LASCARRO, A. K. G.; SIERRA, J. D. P. **Eficiencia comparativa entre dos diluyentes para la criopreservación de semen en toros Brahmán en el departamento de Antioquia**. 2013. 70f. TCC (Graduação em Medicina Veterinária) - Facultad de Ciencias Agropecuárias, Universidad De La Salle, Bogotá - Colômbia.

LEITE, P. A.; SCHREDERA, G. G.; ALMEIDA, C. L. R. de; ZÚCCARIA, C. E. S. N.; COSTA E SILVA, E. V. da. Criopreservação do Sêmen Bovino. **UNOPAR Cient., Ciênc. biol. saúde**, Londrina-PR, v.13, n.4, p. 279-286, mai. 2011.

LIMA, J. P. R. P. **Avaliação da Criopreservação e posterior Capacidade Fecundante de Sêmen de Touro da Raça Brava a partir da recolha *Post-Mortem***. 2014. 74f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica) - Departamento de Ciências Agrárias, Engenharia Zootécnica Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo - Portugal.

LUZ, H. K. M.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G. da; FIGUEIREDO, J. R. de; RODRIGUES, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre-RS, v.39, n.2, p.1-13, 2011.

MADEIRA, E.M.; BIANCHI, I.; VIEIRA, M.B.; SCHNEIDER, A.; SEVERO, N.C.; PFEIFER, L.F.M.; CORRÊA, M.N. Avaliação de diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de touros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte-MG, v.65, n.2, p.415-420, abr. 2013.

MARQUES FILHO, W. C. et al. Avaliação do estresse em touros Nelore (*Bos tauri* indicus) submetidos à eletroejaculação. **Vet. e Zootec.**, Botucatu-SP, v.15, n.3, p. 531-541, dez. 2008.

MARQUES, M.; MENDES, R. **Epermocitologia**. Brasília, Curso de Farmácia Uni-Anhanguera. Disponível em < <http://www.unianhanguera.edu.br> >. Acesso em 20 de ago. de 2017.

MARTINS, C. F.; DODE, M. A. N.; SILVA, A. E. D.F. **Atlas de morfologia espermática bovina**. Brasília - DF: Embrapa, 2016. 100p.

MARTINS, L. F.; PINHO, R. O.; SIQUEIRA, J. B.; DOMENECK, F.; MIRANDA NETO, T.; GUIMARÃES, J. D. Avaliação da Qualidade do Sêmen Fresco de Touros Jovens da Raça Composto Tropical Montana e suas Correlações com o Teste Hiposmótico. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró-RN, v.6, n.3, p.192-198, 2012.

MAZIERO, R. R. D.; CRESPILO, A. M.; FREITAS-DELL'AQUA, C. de P.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. **Rev. Bras. Reprod. Anim. Supl.**, Belo Horizonte-MG, n.6, p.5-10, dez. 2009.

MELLO, R. R. C. et. al. Puberdade e maturidade sexual em touros bovinos. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-árido**, Campus de Patos-PB, v.10, n.3, p. 11-28, jul/set. 2014.

MIRANDA NETO, T.; CASTILHO, E. F. de; PINHO, R. O.; GUIMARÃES, S. E. F.; COSTA, E. P. da; GUIMARÃES, J. D. Puberdade e maturidade sexual em touros jovens da raça Simental, criados sob regime extensivo em clima tropical. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa-MG, v.40, n.9, p.1917-1924, set. 2011.

MONTEIRO, F. M.; OLIVEIRA, L. Z.; OLIVEIRA, C. S.; TETZNER, T. A. D.; MERCADANTE, M. E. Z.; BRANCO, R. H.; GARCIA, J. M. Avaliação Andrológica de Touros Jovens de Diferentes Raças Seleccionados para Peso Pós-Desmama. **B. Indústr. anim.**, Nova Odessa, v.68, n.1, p. 037-043, jan/jun. 2011.

NASCIMENTO, P. S.; CHAVES, M. S.; SANTOS FILHO, A. S. dos; GUIDO, S. I.; GUERRA, M. M. P.; BARTOLOMEU, C. C. Produção In Vitro de Embriões Utilizando-se Sêmen Sexado de Touros 5/8 Girolando. **Ciênc. anim. bras.** Goiânia-GO, v.16, n.3, p. 358-368, jul/set. 2015.

OLIVEIRA, L. Z.; OLIVEIRA, C. S.; MONTEIRO, F. M.; LIMA, V. F. M. H. de; LIMA, F. M. de; COSTA, M. Z. Efeito da idade sobre as principais características andrológicas de touros Brangus – Ibagé criados extensivamente no estado do Mato Grosso do Sul – Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre-RS, v.39, n.1, pub. 946, 8p. jan/mar. 2011.

PAPA, F. O.; CRESPILO, A. M.; FREITAS DELL`AQUA, C. P.; DELL `AQUA JR, J. A. Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de avaliação. Biotecnologia da Reprodução em Bovinos. **Anais...** In: 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina – PR, 2008.

PRADO, R. B.; KOIVISTO, M. B.; CARREIRA, J. T.; PERRI, S. H. V.; RODRIGUES, L. H.; ATIQUÉ NETTO, H.; TORREGROSSA, T. L. G.; VICENTE, W. R. R.; FELICIANO, M. A. R. Efeito da utilização de diferentes diluidores para a produção *in vitro* de embriões bovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte-MG, v.64, n.5, p.1118-1126, mai. 2012.

QUEIROZ, V. L. D.; COSTA FILHO, L. C. C. da; ROSA, L. da S.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA e SILVA, E. V. Sazonalidade na congelabilidade de sêmen bovino. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama-PR, v.18, n.1, p. 39-47, jan./mar. 2015.

REECE, W. O. **Reprodução de Machos**. In: Anatomia Funcional e Fisiologia dos Animais Domésticos. 3ª ed. São Paulo: Roca, 2014, cap.13, p.358-380.

SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre-RS, v.28, n.167, p. 36-39, jan/fev. 2009.

SILVA, A. E. D. F.; DIAS, A. L.; UNANIAN, M. M.; FREITAS, A. R. de; BLOCH JUNIOR, C. Conteúdo de Peptídeos e Avaliação Morfofisiológica dos Espermatozoides do Epidídimo e Ejaculado de Bovinos. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa-MG, v.32, n.6, p.1890-1900, jun. 2003 (Supl. 2).

SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P. da; HENRY, M.; TORRES, C. A. A.; SILVA, M. V. G. da; SILVEIRA, T. da S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa-MG, v.36, n.2, p.387-395, fev. 2007.

TEIXEIRA, L. V. **Estudo da Coleta e Processamento de Sêmen Bovino**. 2009. 37f. Monografia (TCC de Medicina Veterinária) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - FMU, São Paulo – SP, Brasil.

VASCONCELOS FILHO, W. F. de. **Eficiência da congelação automatizada na viabilidade de sêmen bovino**. 2010. 58f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Zootecnia, Seropédica – RJ, Brasil.

CAPÍTULO 2- ARTIGO 1

QUALIDADE DO SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ESPERMÁTICAS

RESUMO

Sabendo que a qualidade do sêmen influencia diretamente na fertilidade do touro, o objetivo do presente experimento foi avaliar a qualidade do sêmen bovino criopreservado em diferentes concentrações espermáticas. O trabalho foi aprovado pela CEUA – UEG. O experimento foi realizado no BIOTEC localizado na Fazenda Escola da UEG Câmpus São Luís de Montes Belos - GO. Foram utilizados três touros da raça Nelore, com idade entre 24 e 36 meses. Foram realizadas duas coletas de sêmen de cada touro, por eletroejaculação, com intervalos de 20 dias. Foram criopreservadas 500 doses de sêmen em palhetas de 0,5 mL, nas concentrações espermáticas: 10×10^6 , 20×10^6 , 30×10^6 , 40×10^6 e 50×10^6 . Foram realizadas as avaliações de motilidade e vigor, TTR/R, TTR/L, CASA e morfologia espermática. O modelo experimental foi o DIC, foram realizados os testes Tukey e de correlação pelo programa estatístico SISVAR a $p < 0,05$. Dentre as concentrações espermáticas avaliadas a de 30×10^6 e 40×10^6 de espermatozoides por palheta foram as que apresentaram melhor qualidade espermática.

Palavras-chave: CASA. Dose inseminante. Espermatozoides. Termorresistência. Viabilidade.

ABSTRACT

Knowing that the quality of the semen directly influences the fertility of the bull, the objective of the present experiment was to evaluate the quality of bovine semen cryopreserved in different sperm concentrations. The work was approved by CEUA - UEG. The experiment was carried out at BIOTEC located at the School Farm UEG Câmpus São Luís de Montes Belos - GO. Three Nelore bulls, aged between 24 and 36 months, were used. Two semen samples were collected from each bull by electroejaculation, with intervals of 20 days. 500 doses of semen were cryopreserved in 0,5 mL vinasse, at sperm concentrations: 10×10^6 , 20×10^6 , 30×10^6 , 40×10^6 and 50×10^6 . Motile and vigor evaluations were performed, TTR / R, TTR / L, CASA and sperm morphology. The experimental model was DIC, Tukey and correlation tests were performed using the SISVAR statistical program at $p < 0,05$. Among the spermatic concentrations evaluated, 30×10^6 and 40×10^6 spermatozoa per reed were the ones that presented better spermatic quality.

Key words: CASA. Dose inseminate. Spermatozoa. Thermoresistance. Viability.

INTRODUÇÃO

O processo de criopreservação do sêmen bovino é um dos fatores que afetam adversamente a motilidade dos espermatozoides (ABUD et al., 2014; DUARTE JÚNIOR et al., 2015), o que, conseqüentemente, afeta sua fertilidade (MORRIS et al., 2012; KAKA et al., 2015; MARINHO et al., 2016), comprometendo a eficiência reprodutiva do touro e a rentabilidade produção pecuária (COJKIC et al., 2017).

As taxas de sobrevivência espermática pós-criopreservação são baixas para a maioria das espécies (MADEIRA et al., 2013). Nos bovinos, cerca da metade de todos os espermatozoides são danificados ou mortos no processo de congelamento, o que reduz a eficácia da preservação de sêmen (LEITE et al., 2011; CAMPANHOLI et al., 2013; SILVA et al., 2013).

A fertilidade é a condição essencial para o progresso genético e alta produtividade animal, podendo ser alterada por condições que afetem a libido ou a cópula e/ou habilidade dos espermatozoides fecundarem o ovócito (WEISS et al., 2015).

Para avaliação da qualidade do sêmen em exames laboratoriais tradicionalmente são realizadas a avaliação de concentração, motilidade e morfologia espermática (CARREIRA et al., 2015). A ligação entre a qualidade do sêmen e a fertilidade foi objeto de inúmeros estudos que demonstraram que a avaliação da qualidade do sêmen deve ser realizada antes (fresca e diluída) e após o congelamento (diluído), através de um microscópio de fase ou pelo sistema de análise computadorizada do movimento espermático (CASA) (CHACUR et al., 2012a).

O Sistema CASA é um método amplamente utilizados na espécie bovina (SILVA et al., 2012; BERGSTEIN et al., 2014). Entretanto, o grande desafio seria apontar qual das diversas variáveis obtidas pelo CASA teriam uma maior influência sobre o potencial de fertilidade do sêmen bovino (ARRUDA et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2015a).

O CASA é um método objetivo e reprodutível das avaliações de motilidade e morfologia dos espermatozoides (CONTRI et al., 2010; SUNDARARAMAN et al., 2012; BERGSTEIN et al., 2014), que permite a avaliação de diferentes características celulares (AMANN e WABERSKI, 2014), e também fornece a resposta sobre a reação dos espermatozoides a inumeros fatores adversos durante

o processamento do sêmen, bem como as variações individuais no sêmen de touros durante os processos tecnológicos (COJKIC et al., 2017).

Os primeiros a sugerir a existência de relação entre a quantidade e a qualidade do sêmen foram Salisbury e VanDemark em 1961, onde propuseram que a fertilidade aumenta com o aumento do número de espermatozoides viáveis inseminados a nível limiar; em 1968 Sullivan e Elliot, relataram que o número mínimo e máximo de espermatozoides móveis necessário para fecundação difere entre touros e para obter altas taxas de prenhez na IA, os touros de baixa fertilidade precisavam de mais sêmen do que os touros de alta fertilidade, devido há presença de espermatozoides anormais; e Pace et al. em 1981, relataram que a fertilidade aumenta com o aumento do número de espermatozoides morfológicamente intactos e móveis (DALTON, 2011).

Sabendo que a manutenção da qualidade seminal pós-descongelamento satisfatória é estratégica para a disseminação de material genético do touro, acredita-se que a concentração espermática na palheta está diretamente relacionada com a qualidade do sêmen bovino. Assim, conhecendo que a qualidade do sêmen influencia diretamente na fertilidade do touro, o objetivo do presente experimento foi avaliar o efeito da concentração espermática na cinética e morfologia espermática do sêmen bovino criopreservado em diferentes concentrações espermáticas.

METODOLOGIA

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Goiás, sob o processo nº 201700020007719.

O experimento foi realizado no BIOTEC - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal localizado na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Goiás Câmpus São Luís de Montes Belos. Foram utilizados três touros da raça Nelore, com idade entre 24 e 36 meses, de valor genético comprovado, com atestado positivo do exame andrológico, em plena atividade sexual e após verificação da sanidade animal, mantidos sob as mesmas condições de manejo e alimentação.

O esgotamento das reservas espermáticas extragonadais foi realizado uma semana antes do início das coletas para criopreservação de sêmen. Foram realizadas duas coletas de sêmen de cada touro, por eletroejaculação (eletroejaculador TK 800[®], Minitub do Brasil Ltda), com intervalos de 20 dias.

Imediatamente após a coleta eram realizadas as avaliações macroscópicas (volume, coloração, odor, movimento de massa, densidade e pH) e microscópicas (concentração, motilidade, vigor e turbilhonamento) do sêmen e só era criopreservado o sêmen que apresentasse no mínimo motilidade 70 % e vigor 3.

Era realizada uma diluição inicial de 1: 1 utilizando o diluente comercial BotuBov[®] (Botupharma Biotecnologia Animal). O sêmen diluído era refrigerado durante 4 horas a 5°C no balcão de refrigeração TK WorkSêmen[®] (Minitub do Brasil Ltda). Duas horas após o início do resfriamento era acrescentado o restante do diluente BotuBov[®] (Botupharma Biotecnologia Animal) para se obter as diferentes concentrações experimentais.

De cada coleta de sêmen eram preparadas palhetas de todas as concentrações experimentais. O sêmen era envasado de forma manual em palhetas francesas de 0,5 mL e então congeladas utilizando a máquina TK 3000[®] (curva de congelamento P1S2) e criopreservadas em botijões com Nitrogênio líquido.

Foram processadas no total 500 doses de sêmen e para determinar a concentração por dose, foi utilizado o Fotômetro Accucell[®] (modelo SDM6, Minitub do Brasil Ltda) que quantificou as células espermáticas. As doses de sêmen experimental foram divididas em cinco concentrações espermáticas diferentes: 10×10^6 , 20×10^6 , 30×10^6 , 40×10^6 e 50×10^6 de espermatozoides por palheta do mesmo ejaculado, sendo 100 doses para cada concentração espermática.

Para realizar as avaliações de motilidade (%) e vigor pós-descongelamento foram descongeladas de cada partida 20 palhetas de sêmen de cada concentração espermática em banho Maria à 37°C por 30 segundos, que foram avaliadas na lâmina em microscópio óptico.

De cada partida 20 palhetas de sêmen de cada concentração espermática foram submetidas ao teste de termorresistência lento (TTR/L) segundo Vogler et al. (1991) e 20 palhetas de sêmen de cada concentração foram submetidas ao teste de termorresistência rápido (TTR/R) segundo Melo Evangelista et al. (2016). No TTR/R, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e foram mantidas a 37°C durante 30 minutos. No TTR/L, as palhetas foram descongeladas

em banho-maria a 37°C por 30 segundos e foram mantidas a 37°C durante 3 horas. Vencidos os respectivos prazos, o sêmen foi examinado entre lâmina e lamínula sob microscópio óptico para avaliação da motilidade espermática progressiva, estimada em porcentagem.

Foram descongeladas de cada partida 10 palhetas de sêmen de cada concentração espermática para análise no CASA. O equipamento CASA utilizado foi o modelo IVOS[®], Hamilton Thorne (Beverly, MA, USA) e foi utilizado o setup para bovinos. As palhetas de sêmen foram descongeladas em banho Maria a 37°C por 30 segundos e foi retirada uma alíquota 2 µL de cada amostra e colocada em lâmina própria com oito câmaras LEJA[®] (Leja Products B.V., NieuwVennep, Holanda), que foi transferida ao CASA onde foram selecionados oito campos homogêneos para avaliação da cinética e das patologias espermáticas.

Os parâmetros avaliados pelo CASA foram: a Motilidade e a Progressividade (expresso em %); as velocidades de trajetória espermática (rápida, média, devagar e estático - expresso em %); os parâmetros de deslocamento do espermatozoide - Velocidade média da trajetória (VAP, expresso em µm/s); Velocidade linear progressiva (VSL, expresso em µm/s); Velocidade curvilínea (VCL, expresso em µm/s); Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, expresso em µm); Frequência de batimento flagelar (BCF, expresso em Hz); Retilinearidade (STR, expresso em %); Linearidade (LIN, expresso em %); Elongação (%) e Área (µm).

Na avaliação da morfologia espermática foram observadas e identificados os espermatozoides: Normal, presença de Gota proximal, presença de Gota distal, Cauda dobrada, Cauda enrolada, DMR (Reflexo Distal em Peça Intermediária), Defeitos de cabeça, Defeito de acrossoma, Defeito na peça intermediária e Decaptado.

O modelo experimental empregado foi o delineamento inteiramente casualizado e os dados tabulados em planilhas do aplicativo Excel[®] do pacote computacional Microsoft Office[®] e as análises estatísticas realizadas pelo programa estatístico SISVAR, através da análise de variância a 5% de significância ($p < 0,05$). Os testes utilizados foram o teste Tukey e o teste de Correlação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comprovadamente o processo de criopreservação provoca danos ao DNA espermático de bovinos (FELIPE-SILVA et al., 2011; RONCOLETTA et al., 2013; MADEIRA et al., 2013; GÜRLER et al., 2016; CASTELO BRANCO et al., 2017), induzidos pelo estresse oxidativo causado por espécies reativas do oxigênio – ROS (LUZ et al., 2011; DUARTE JÚNIOR et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015; QUEIROZ et al., 2015; MARINHO et al., 2016).

O plasma seminal possui uma capacidade antioxidante natural que varia entre touros (KARUNAKARAN e DEVANATHAN, 2017), mas se mantém a mesma entre os ejaculados (GÜRLER et al., 2015), entretanto a falta de mecanismos funcionais de reparação de DNA torna os espermatozoides mais vulneráveis aos ROS do que outros tipos de células (FRASER et al., 2011; JOHNSTON et al., 2012).

A qualidade do sêmen depende da integridade e função de todas as estruturas que compõem a célula espermática, tais como a membrana plasmática, o flagelo, as mitocôndrias, o acrossoma e a cromatina, que geralmente são avaliadas por técnicas separadas, que nem sempre correspondem à capacidade real de fecundação do espermatozoide (ARRUDA et al., 2011; KARUNAKARAN e DEVANATHAN, 2017; CELEGHINI et al., 2017).

Dentre os atributos necessários para a fecundação a motilidade e a morfologia espermáticas são as características mais usadas nas avaliações para estimar a fertilidade do sêmen bovino (ZÚCCARI et al., 2009; CHACUR et al., 2012b; LIMA et al., 2013; BERGSTEIN et al., 2014). A correlação entre a motilidade espermática e a fertilidade do sêmen é muito variável, podendo estar entre $r = 0,15$ e $0,83$ na análise subjetiva e entre $r = 0,82$ a $0,98$ na análise computadorizada (CARVALHO et al., 2009).

Vários estudos associaram a alta motilidade com a habilidade de fertilização dos espermatozoides (BERTOL et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2015a), já que, espermatozoides com motilidade reduzida, além de estarem comprometidos quanto a sua capacidade fecundante (LEMMA, 2011), também possuem menor habilidade para sofrerem capacitação, apresentam maior produção de radicais livres e dificuldades de realizar processos chaves na fertilização do ovócito (AITKEN et al., 2012; EL-SHAHAT et al., 2018).

A avaliação da motilidade espermática do sêmen criopreservado no descongelamento é um parâmetro usado para determinar a qualidade do sêmen de touros destinados aos programas de IA (CASTELO BRANCO et al., 2017). Os ejaculados com maior proporção de espermatozoides de alta motilidade progressiva são considerados mais criorresistentes e possuem maior longevidade à incubação nas avaliações no descongelamento (ARRUDA et al., 2010).

A concentração espermática por palheta do sêmen criopreservado diferiu $p < 0,05$ na avaliação da motilidade espermática do sêmen no descongelamento, no TTR/R, no TTR/L e na progressividade espermática (tabela 1).

Tabela 1: Avaliação da motilidade (%) do sêmen bovino em diferentes concentrações espermáticas.

Avaliação	10 x10⁶	20 x10⁶	30 x10⁶	40 x10⁶	50 x10⁶	p	Cv%
Sêmen fresco	85,84 ^a	85,84 ^a	85,84 ^a	85,84 ^a	85,84 ^a	1,0000	5,42
Sêmen criopreservado							
Descongelamento							
30 segundos	54,58 ^c	59,58 ^{bc}	68,33 ^a	65,83 ^{ab}	63,33 ^{ab}	0,0000	8,89
TTR/R	29,17 ^b	30,83 ^b	52,08 ^a	54,58 ^a	50,83 ^a	0,0000	17,43
TTR/L	11,25 ^c	18,33 ^b	23,75 ^{ab}	25,83 ^a	22,92 ^{ab}	0,0000	28,63
Motilidade - CASA	43,25 ^a	44,08 ^a	49,50 ^a	46,83 ^a	42,58 ^a	0,0898	15,05
Progressividade - CASA	33,42 ^{ab}	32,58 ^{ab}	37,91 ^a	33,58 ^{ab}	29,83 ^b	0,0283	17,47

Sêmen fresco %; Descongelamento (30 segundos) %; TTR/R - Teste de Termorresistência Rápido (30 minutos); TTR/L - Teste de Termorresistência Lento (3 horas); Motilidade espermática (CASA) % e Progressividade espermática (CASA) %.

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste Tukey.

A alta motilidade e vigor espermática inicial, observados no sêmen fresco, não garantem um bom desempenho no processo de criopreservação, entretanto, permite que o sêmen de touros com altas quedas da motilidade seja aprovado no pós-descongelamento (CHACUR et al., 2012b). Proporções de espermatozoides vivos e sua resistência durante o pós-descongelamento e incubação, são significativamente correlacionados com a incidência de um subpopulação de espermatozoides nos ejaculados frescos (COJKIC et al., 2017).

Chenoweth (2005) em seu estudo relatou que a redução da fertilidade ocorrida por falhas dos espermatozoides em atingirem o local da fecundação devido à baixa motilidade espermática, pode ser compensado com o aumento do número de células espermáticas na dose inseminante. O que pode ser observado neste trabalho, já que a concentração de 30×10^6 de espermatozoides por palheta obteve maior motilidade no descongelamento (68,33 %), motilidade total (49,50 %) e progressividade espermática (37,91 %), apesar de ser a concentração apresentou maior número de espermatozoides com cauda dobrada (3,0) e decapitado (3,42). E a concentração de 40×10^6 de espermatozoides por palheta teve melhor desempenho no TTR/R (54,58 %) e no TTR/L (25,83 %), mesmo possuindo o maior número de espermatozoides com defeito na peça intermediária (0,67).

Embora os resultados dos testes de laboratório não permitam uma avaliação precisa do potencial de fertilização da amostra de sêmen, estes testes são importantes para permitir a eliminação de amostras de baixa qualidade, já que, espermatozoides com morfologia anormal podem falhar em diferentes etapas de fertilização, dependendo da natureza da anormalidade e do defeito do espermatozoide (CARREIRA et al., 2015).

Os parâmetros de cinética espermática, como a motilidade total e a progressividade espermática, possuem grande correlação com a fertilidade e com a viabilidade avaliada nos testes de integridade de membrana (CHACUR et al., 2012b; KAKA et al., 2015), que fornecem informações valiosas sobre a integridade estrutural e atividade bioquímica da membrana, e possuem alta correlação com a viabilidade da célula espermática (BOSCARATO et al., 2016).

Nas avaliações do sêmen realizadas neste estudo à $p < 0,05$ foi constatada uma superioridade da concentração de 30×10^6 de espermatozoides por palheta, que obteve a maior motilidade total (49,50 %) e progressividade espermática (37,91 %), seguida pela concentração de 40×10^6 de espermatozoides por palheta, que obteve a

maior motilidade total (46,83 %) e progressividade espermática (33,58 %). Esse resultado sugere que dentre as concentrações avaliadas, as de 30×10^6 e 40×10^6 de espermatozoides por palheta são as que apresentaram melhor qualidade espermática.

Santos (2016) estudando touros das raças Nelore, Angus e Brahman, dividiu as partidas de sêmen em superior e inferior, de acordo com cada característica espermática e observou que isso não refletiu no índice de fertilidade na IATF ($p < 0,05$). Entretanto, para motilidade espermática e progressividade foi encontrada diferença entre as partidas e no índice de fertilidade ($p < 0,01$), o autor concluiu que os padrões de qualidade de partidas de sêmen que apresentam fertilidade distinta podem ser semelhantes nas características avaliadas, além disso, que pode haver diferença na qualidade espermática entre as partidas que não influenciam a fertilidade.

O teste de termorresistência é capaz de avaliar touros e ejaculados com boa congelabilidade, mas não consegue prever a capacidade fecundante em programas de IA (MARTINS et al., 2015). Neste trabalho, nas avaliações do TTR/R a concentração de 40×10^6 de espermatozoides por palheta teve a maior motilidade espermática e vigor (54,58 % e 3,00), o que também foi observado no TTR/L (25,83 % e 2,25).

Prado et al. (2012), avaliando sêmen de touros da raça Nelore, descreveram que após a realização do TTR/L, observou-se uma queda gradual da motilidade espermática e do vigor, o que sugere que, essa queda possa ser decorrente da perda de componentes intracelulares ou de lesões estruturais na cauda dos espermatozoides no descongelamento. Essa queda gradual da motilidade espermática e do vigor foi observada nas avaliações do sêmen em todas as concentrações avaliadas neste trabalho.

A concentração espermática do sêmen bovino criopreservado diferiu $p < 0,05$, na avaliação da morfologia espermática (tabela 2).

Tabela 2: Avaliação das patologias do sêmen bovino criopreservado em diferentes concentrações espermáticas.

PATOLOGIA	10 x10 ⁶	20 x10 ⁶	30 x10 ⁶	40 x10 ⁶	50 x10 ⁶	p	cv%
NORMAL	82,16 ^a	79,33 ^{ab}	75,50 ^b	79,08 ^{ab}	76,50 ^b	0,0040	5,51
PROXIMAL	0,25 ^a	0,08 ^a	0,17 ^a	0,08 ^a	0,08 ^a	0,6089	234,79
DISTAL	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,0000	0,00
DOBRADA	1,50 ^a	2,75 ^a	3,00 ^a	2,50 ^a	2,75 ^a	0,4275	82,11
ENROLADA	2,83 ^b	3,41 ^{ab}	4,66 ^{ab}	2,42 ^b	5,58 ^a	0,0158	58,17
DMR	1,41 ^c	2,25 ^{bc}	4,00 ^{ab}	3,58 ^{ab}	4,50 ^a	0,0001	52,07
CABEÇA	3,17 ^a	3,00 ^a	2,50 ^a	2,33 ^a	1,58 ^a	0,1619	65,71
ACROSSOMA	6,75 ^a	6,75 ^a	6,16 ^a	6,67 ^a	6,75 ^a	0,9898	48,93
INTERMEDIÁRIA	0,67 ^a	0,67 ^a	0,58 ^a	0,67 ^a	0,50 ^a	0,9874	145,77
DECAPTADO	1,25 ^a	1,75 ^a	3,42 ^a	2,17 ^a	1,75 ^a	0,0819	92,76

NORMAL: Espermatozoide sem defeito; PROXIMAL: Presença de gota proximal no espermatozoide; DISTAL: Presença de gota distal no espermatozoide; DOBRADA: Espermatozoide com cauda dobrada; ENROLADA: Espermatozoide com cauda enrolada; DMR: Reflexo distal em peça intermediária; CABEÇA: Espermatozoide com defeitos de cabeça; ACROSSOMA: Espermatozoide com defeito de acrossoma; INTERMEDIÁRIA: Espermatozoide com defeito na peça intermediária e DECAPTADO: Espermatozoide com apenas a cabeça.

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

Na avaliação da morfologia espermática a concentração de 10×10^6 espermatozoides por palheta apresentou maior número de espermatozoides normal (82,16) e a concentração de 50×10^6 espermatozoides por palheta apresentou maior número de espermatozoides com cauda enrolada (5,58) e DMR (4,50), e nenhuma das concentrações avaliadas não apresentaram gota distal (0,0).

Blom em 1972 criou a classificação para as alterações morfológicas do espermatozoide, considerando-os como defeitos maiores e defeitos menores; e Saacke em 2008 propôs uma nova classificação, dividindo-os em defeitos compensáveis ou não compensáveis. Nessa nova classificação, os espermatozoides que apresentam defeitos compensáveis (defeitos de cauda, gotas citoplasmáticas e defeitos de cabeça), podem ter reduzida a fertilidade devido à redução da motilidade espermática, incapacitando-os em alcançar o local da fertilização e para os autores um aumento no número de espermatozoides funcionalmente competentes poderia resolver o problema de fertilidade do ejaculado ou até mesmo da partida de sêmen (ARRUDA et al., 2015).

Apesar de ser considerado um defeito compensável, os espermatozoides com cabeças deformadas não participam da fertilização do ovócito por apresentar baixa motilidade progressiva e não conseguir penetrar a zona pelúcida, o que justifica sua exclusão. Entretanto, para Dalton (2011), esses espermatozoides aparentemente anormais desempenham um papel acessório no processo de fertilização, devido à melhora da qualidade do sêmen por elevar a dosagem de espermatozoides inseminados.

A morfologia é o aspecto isolado que mais se relaciona com a viabilidade e a fertilidade (FRENEAU, 2011; CAVALERO et al., 2015), apresentando uma correlação alta com a fertilidade (ARRUDA et al. 2011). A avaliação morfológica dos espermatozoides é considerada de grande importância econômica e biológica devido à relação desta com a fertilidade (JANUSKAUSKAS et al., 2001).

Chacur et al. (2014), estudando o sêmen de touros das raças Nelore e Simental, observaram que a época seca do ano, modificou o perfil da morfologia espermática, reduzindo o número de espermatozoides com defeitos maiores e defeitos totais. Também observaram que uma moderada elevação da temperatura testicular nos touros reduziu drasticamente a motilidade progressiva, o número de espermatozoides viáveis e aumentou a porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais.

Martins et al. (2015), avaliando touros da raça Nelore, observaram ao analisar os aspectos físicos e morfológicos do sêmen *in natura*, que os animais testados apenas diferiram entre si em relação aos defeitos espermáticos maiores ($p < 0,05$) e em relação aos aspectos físicos no pós-descongelamento não diferiram entre as partidas dos diferentes touros.

Tem sido relatado que animais com alta prevalência de espermatozoides com defeitos de acrossoma possuem uma redução da fertilidade (EMERICK et al., 2011). Acredita-se que com o aumento da idade do touro, ocorre também um aumento no percentual de células espermáticas com membrana intacta após o processo de criopreservação. Talvez o aumento da competência estrutural e funcional associada à capacidade de criorresistência possa estar relacionado ao volume da cabeça do espermatozoide detectada pela análise morfométrica, uma vez que esse diminui com o avanço da idade e as características indicativas de boa congelabilidade aumentam (MARTÍ et al., 2011; EMERICK et al., 2011).

A concentração espermática por palheta do sêmen criopreservado influenciou $p < 0,05$, nos parâmetros de deslocamento dos espermatozoides (tabela 3).

Tabela 3: Avaliação dos parâmetros de deslocamento do sêmen bovino criopreservado em diferentes concentrações espermáticas (média $\pm$ desvio padrão).

Parâmetro	10 x10 ⁶	20 x10 ⁶	30 x10 ⁶	40 x10 ⁶	50 x10 ⁶	p	cv%
VAP	81,96 $\pm$ 26,19 ^a	83,73 $\pm$ 29,64 ^a	81,79 $\pm$ 27,82 ^a	79,34 $\pm$ 29,46 ^a	79,14 $\pm$ 30,35 ^a	0,1890	6,54
VSL	70,02 $\pm$ 22,72 ^a	70,94 $\pm$ 26,71 ^a	70,21 $\pm$ 25,76 ^a	67,61 $\pm$ 28,03 ^a	67,55 $\pm$ 28,92 ^a	0,1308	5,78
VCL	135,43 $\pm$ 57,52 ^a	138,35 $\pm$ 59,34 ^a	131,28 $\pm$ 54,01 ^a	128,68 $\pm$ 54,03 ^a	127,89 $\pm$ 54,20 ^a	0,1330	8,59
ALH	5,58 $\pm$ 2,97 ^a	5,66 $\pm$ 2,86 ^a	5,28 $\pm$ 2,79 ^a	5,48 $\pm$ 2,89 ^a	5,37 $\pm$ 2,81 ^a	0,3923	9,47
BCF	29,83 $\pm$ 10,25 ^c	31,72 $\pm$ 11,29 ^{bc}	32,92 $\pm$ 12,06 ^{ab}	32,43 $\pm$ 11,91 ^{ab}	34,07 $\pm$ 12,73 ^a	0,0000	5,23
STR	86,75 $\pm$ 13,50 ^a	85,75 $\pm$ 14,83 ^a	86,67 $\pm$ 14,83 ^a	85,25 $\pm$ 15,50 ^a	85,50 $\pm$ 15,50 ^a	0,2035	2,22
Linearidade	57,83 $\pm$ 16,96 ^a	56,25 $\pm$ 17,41 ^a	59,00 $\pm$ 17,25 ^a	56,25 $\pm$ 17,75 ^a	56,50 $\pm$ 18,08 ^a	0,0686	4,83
Elongação	44,42 $\pm$ 10,59 ^b	45,58 $\pm$ 11,88 ^{ab}	45,42 $\pm$ 12,32 ^{ab}	46,50 $\pm$ 13,24 ^a	45,75 $\pm$ 12,57 ^{ab}	0,0122	3,01
Área	6,06 $\pm$ 1,75 ^c	6,31 $\pm$ 2,08 ^c	6,41 $\pm$ 2,42 ^{bc}	6,94 $\pm$ 3,01 ^a	6,81 $\pm$ 3,26 ^{ab}	0,0000	6,11

VAP - Velocidade média da trajetória ($\mu\text{m/s}$); VSL - Velocidade linear progressiva ($\mu\text{m/s}$); VCL - Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$); ALH - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (μm); BCF - Frequência de batimento flagelar (Hz); STR - Retilinearidade (%); Linearidade (%); Elongação (%) e Área (μm).

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

A concentração de 40×10^6 de espermatozoides por palheta obteve maior Elongação ($46,50 \pm 13,24$) e Área de deslocamento dos espermatozoides ($6,94 \pm 3,01$); e a concentração de 50×10^6 de espermatozoides por palheta obteve maior BCF ($34,07 \pm 12,73$).

Para Chacur et al. (2012b) e Nascimento et al. (2015b), os parâmetros de movimentação espermática analisados pelo CASA, estão relacionados com a taxa de fecundação, devido a grande correlação da VCL e da ALH com a taxa de fecundação *in vitro* de ovócitos. Segundo os autores a ALH é caracterizada por movimentos espermáticos que resultaram na elevação do gasto de energia dos espermatozoides durante o deslocamento, já a BCF e a STR resultaram em movimentos espermáticos progressivos mais rápidos, devido a maior força propulsora do espermatozoide e a BCF e a LIN apresentaram correlação positiva com a taxa de prenhez e podem ser usado para fornecer informações úteis para melhor uso do sêmen nas fêmeas.

Diversas pesquisas descrevem que a porcentagem elevada de VAP, VSL, VCL e ALH, como as encontradas neste trabalho, condizem com a hiperativação espermática que é considerada um componente do processo de capacitação dos espermatozoides (PRADO et al., 2012).

A BCF alta e a ALH baixa, encontradas neste trabalho, são características que em conjunto se relacionam com a boa capacidade do espermatozoide em penetrar o muco cervical da fêmea. Além disso, as concentrações avaliadas tiveram altos valores STR e LIN, o que denota boa movimentação retilínea, favorecendo o trânsito através do útero e a fecundação (MONTESINOS et al., 2015), o que favorece a fertilização mecânica durante a etapa da capacitação espermática dentro do trato reprodutivo da fêmea.

As velocidades de deslocamento dos espermatozoides diferiram em relação às concentrações espermáticas avaliadas $p < 0,05$ (tabela 4).

Tabela 4: Avaliação das velocidades de deslocamento dos espermatozoides em diferentes concentrações espermáticas.

Velocidade	10 x10⁶	20 x10⁶	30 x10⁶	40 x10⁶	50 x10⁶	p	cv%
Rápido	38,09 ^a	37,67 ^a	42,25 ^a	38,92 ^a	35,00 ^a	0,1637	18,05
Médio	5,17 ^b	6,50 ^{ab}	6,92 ^{ab}	8,50 ^a	8,34 ^a	0,0005	28,97
Devagar	7,42 ^c	10,75 ^{bc}	12,67 ^b	18,84 ^a	19,50 ^a	0,0000	21,34
Estático	49,00 ^a	45,09 ^{ab}	38,00 ^{bc}	33,75 ^c	36,92 ^{bc}	0,0001	20,05

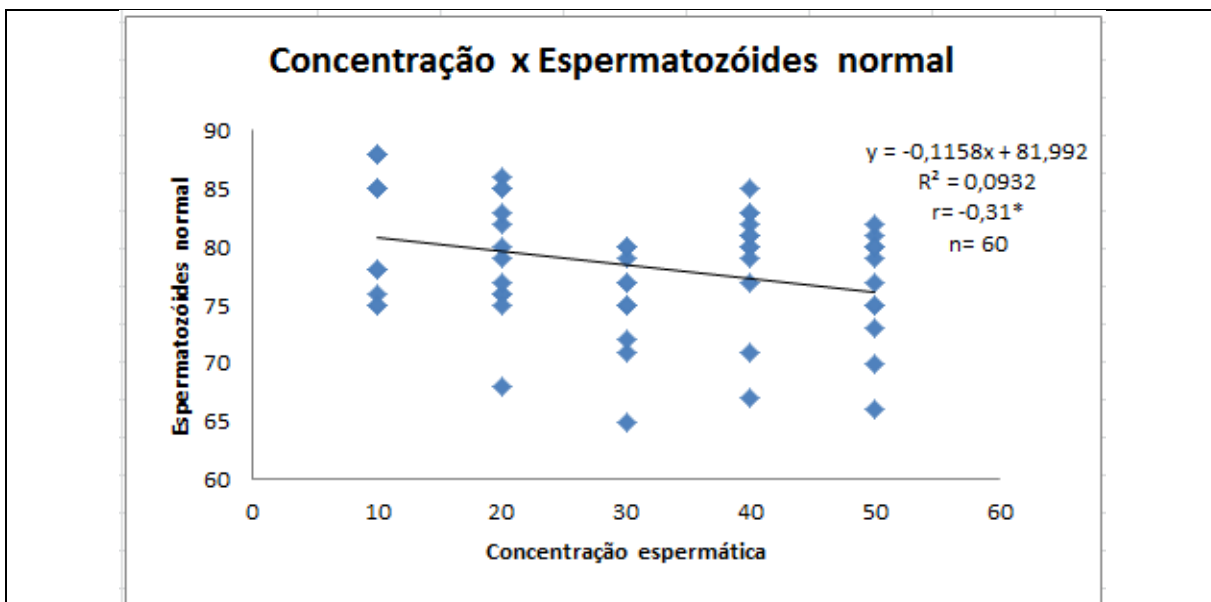
Velocidades: Rápido %; Médio %; Devagar % e Estático %.

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste Tukey.

As concentrações de 40×10^6 e 50×10^6 de espermatozoides por palheta tiveram as maiores porcentagens de velocidade de deslocamento médio 8,50 % e 8,35 % respectivamente, também tiveram as maiores porcentagens de velocidade de deslocamento devagar 19,50 % (50×10^6 de espermatozoides por palheta) e 18,84 % (40×10^6 de espermatozoides por palheta); e a concentração de 10×10^6 de espermatozoides por palheta teve a maior porcentagem de velocidade de deslocamento estático 49,00 %.

Houve correlação entre a concentração espermática e o número de espermatozoides normal, com $r = -0,31$ (gráfico 1).

Gráfico 1: Correlação entre a concentração espermática e o número de espermatozoides normal do sêmen bovino criopreservado.



Concentrações espermáticas avaliadas: 10×10^6 ; 20×10^6 ; 30×10^6 ; 40×10^6 e 50×10^6 espermatozoides por palheta de 0,5 mL.

Diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Correlação a 5%.

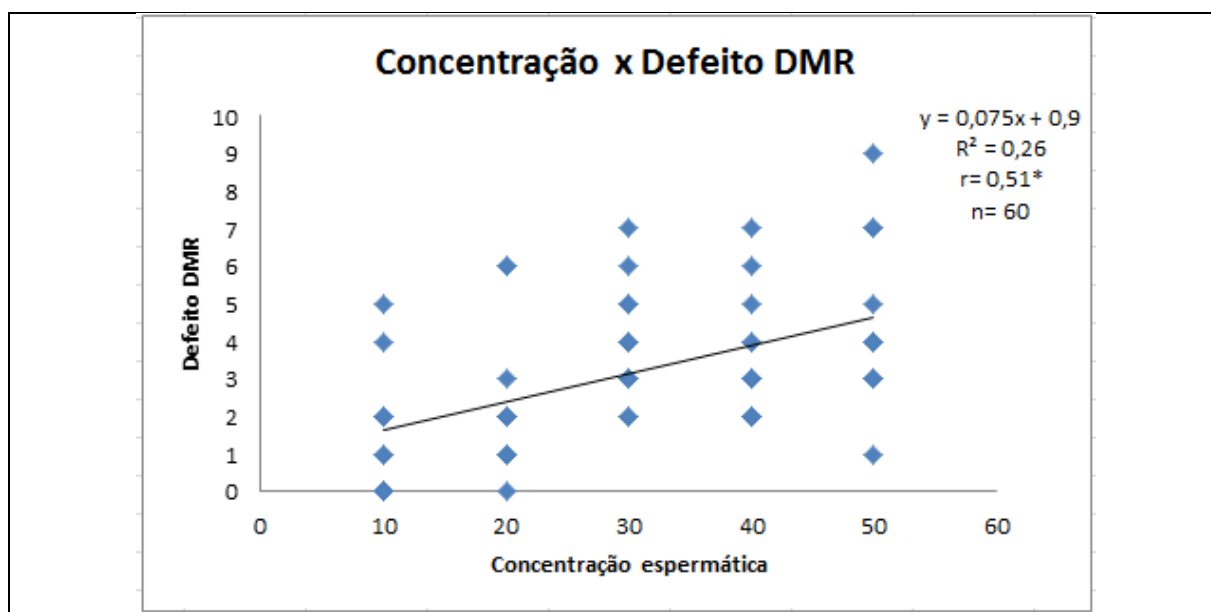
Nesse caso, a correlação encontrada entre as variáveis foi negativa, ou seja, à medida que a concentração espermática da palheta aumentou o número de espermatozoides normal diminuiu.

Em seu trabalho Pesh e Bergmann (2006), consideraram que defeitos específicos na morfologia estrutural dos espermatozoides estão diretamente correlacionados com a sub e infertilidade do macho. Rodriguez-Martinez (2005) discorrendo sobre a correlação entre a morfologia espermática e fertilidade,

observando um grande número de estudos, afirmou que a correlação entre morfologia espermática e fertilidade é muito variável $r = 0,06$ a $0,86$.

Houve correlação entre a concentração espermática e o número de espermatozoides com defeito DMR, $r = 0,51$ (gráfico 2).

Gráfico 2: Correlação entre a concentração espermática e o número de espermatozoides com defeito de DMR do sêmen bovino criopreservado.



Concentrações espermáticas avaliadas: 10×10^6 ; 20×10^6 ; 30×10^6 ; 40×10^6 e 50×10^6 espermatozoides por palheta de 0,5 mL.

DMR - Reflexo Distal em Peça Intermediária.

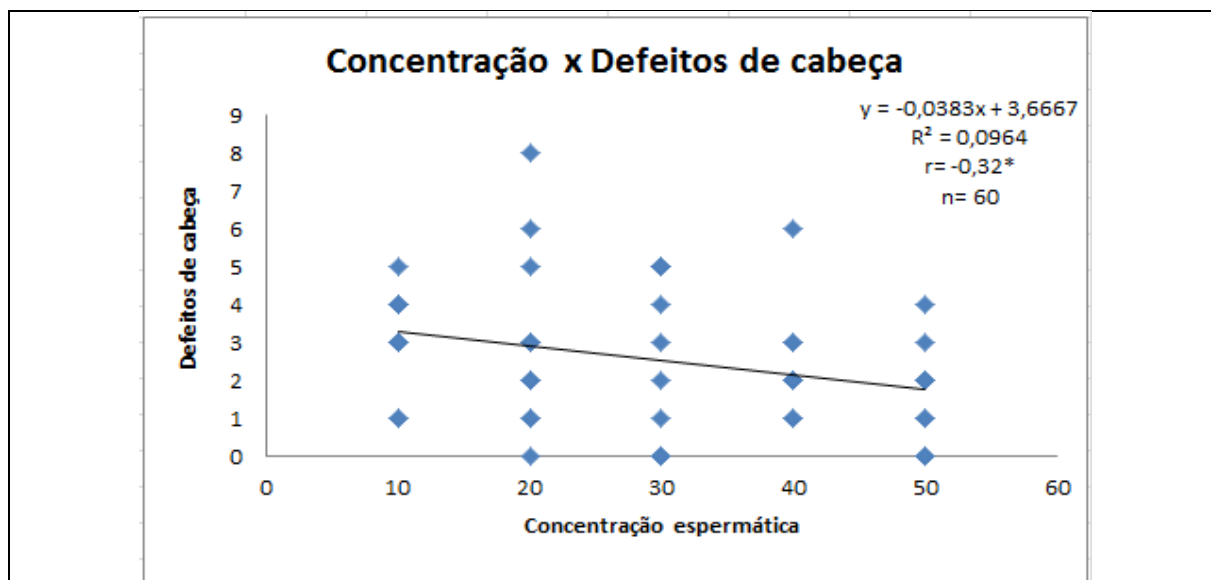
Diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Correlação a 5%.

A correlação entre a concentração espermática e o número de espermatozoides com defeito DMR foi positiva, isso significa que à medida que a concentração espermática por palheta aumentou o número de espermatozoides com defeito de DMR também aumentou.

Arruda et al. (2011), em seu trabalho verificaram que a motilidade progressiva do sêmen apresentou uma correlação negativa baixa com defeitos menores $r = -0,09$ a $p < 0,01$, concluindo que a motilidade progressiva pode ser alterada com o aumento da percentagem de defeitos espermáticos, principalmente de cauda ou peça intermediária.

Foi encontrada correlação entre a concentração espermática e o número de espermatozoides com defeitos de cabeça, com $r = -0,32$ (gráfico 3).

Gráfico 3: Correlação entre a concentração espermática e o número de espermatozoides com defeitos de cabeça do sêmen bovino criopreservado.



Concentrações espermáticas avaliadas: 10×10^6 ; 20×10^6 ; 30×10^6 ; 40×10^6 e 50×10^6 espermatozoides por palheta de 0,5 mL.

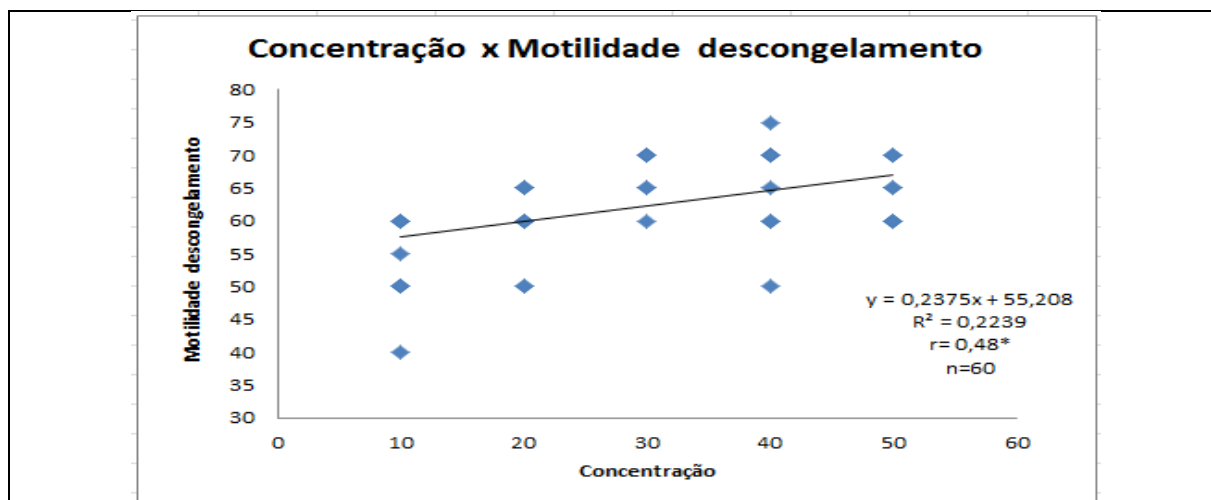
Diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Correlação a 5%.

A correlação entre a concentração espermática e o número de espermatozoides com defeitos de cabeça foi negativa, ou seja, à medida que a concentração espermática da palheta aumentou o número de espermatozoides com defeitos de cabeça diminuiu.

O que também foi relatado por Freneau et al. (2017), que identificaram uma correlação negativa entre os defeitos espermáticos totais ($r = -0,16$) e maiores ($r = -0,22$) com a taxa de prenhez do rebanho ($p < 0,01$), segundo os autores a morfologia espermática foi a característica isolada que teve mais repetibilidade e relação com o números de bezerros gerados por touro.

Houve correlação entre a concentração espermática e a motilidade do sêmen bovino no descongelamento de 30 segundos, com $r = 0,48$ (gráfico 4).

Gráfico 4: Correlação entre a concentração espermática e a motilidade no descongelamento do sêmen bovino criopreservado.



Concentrações espermáticas avaliadas: 10×10^6 ; 20×10^6 ; 30×10^6 ; 40×10^6 e 50×10^6 espermatozoides por palheta de 0,5 mL.
 Diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Correlação a 5%.

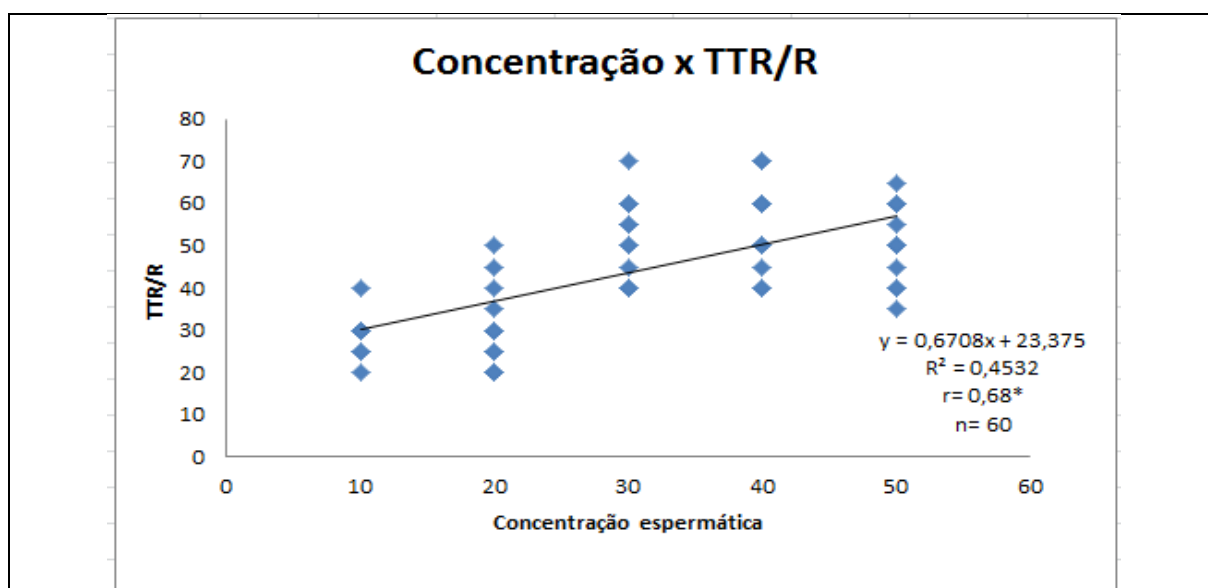
A correlação encontrada entre as variáveis estudadas foi positiva, e explica-se pelo fato de que o aumento da concentração espermática por palheta fez com que houvesse um aumento da motilidade espermática do sêmen bovino no descongelamento.

Estudando touros da raça Nelore, Silveira et al. (2010), expuseram que a motilidade apresentou correlação de média a alta com vigor $r = 0,68$, corroborando com o estudo de Dias et al. (2008), que relataram uma correlação de $r = 0,81$ entre a motilidade e o vigor espermáticos.

Guerra Neto et al. (2012) em seu trabalho, encontraram correlação significativa entre os parâmetros motilidade espermática e vigor de $r = 0,41$ à $p < 0,05$, para os autores novos estudos devem ser realizados para verificar a relação entre as características qualitativas e quantitativas do sêmen com os índices reprodutivos. No entanto, é importante conhecermos sua influência na viabilidade espermática de touros mantidos em rebanhos (MARINHO et al., 2016).

Houve correlação entre a concentração espermática e a motilidade no TTR/R, o coeficiente de correlação foi $r = 0,68$ (gráfico 5).

Gráfico 5: Correlação entre a concentração espermática e o TTR/R do sêmen bovino criopreservado.

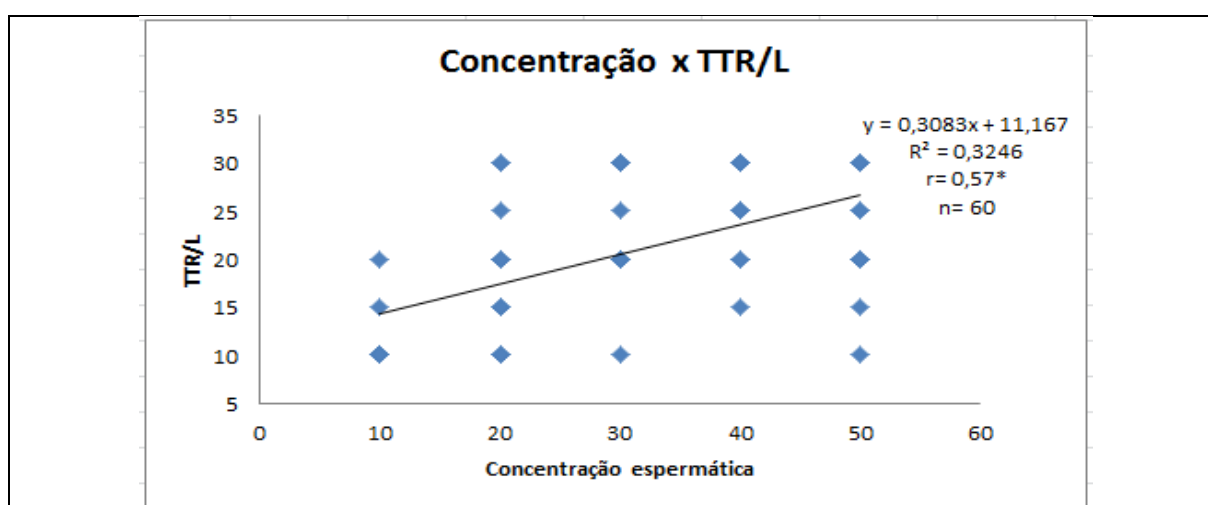


Concentrações espermáticas avaliadas: 10×10^6 ; 20×10^6 ; 30×10^6 ; 40×10^6 e 50×10^6 espermatozoides por palheta de 0,5 mL. TTR/R - Teste de termorresistência rápido. Diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Correlação a 5%.

A correlação entre as variáveis estudadas foi considerada positiva e deve-se ao fato de que o aumento da concentração espermática por palheta fez com que houvesse um aumento da motilidade espermática do sêmen bovino no TTR/R.

Encontrou-se correlação entre a concentração espermática e a motilidade no TTR/L, o coeficiente de correlação foi $r = 0,57$ (gráfico 6).

Gráfico 6: Correlação entre a concentração espermática e o TTR/L do sêmen bovino criopreservado.

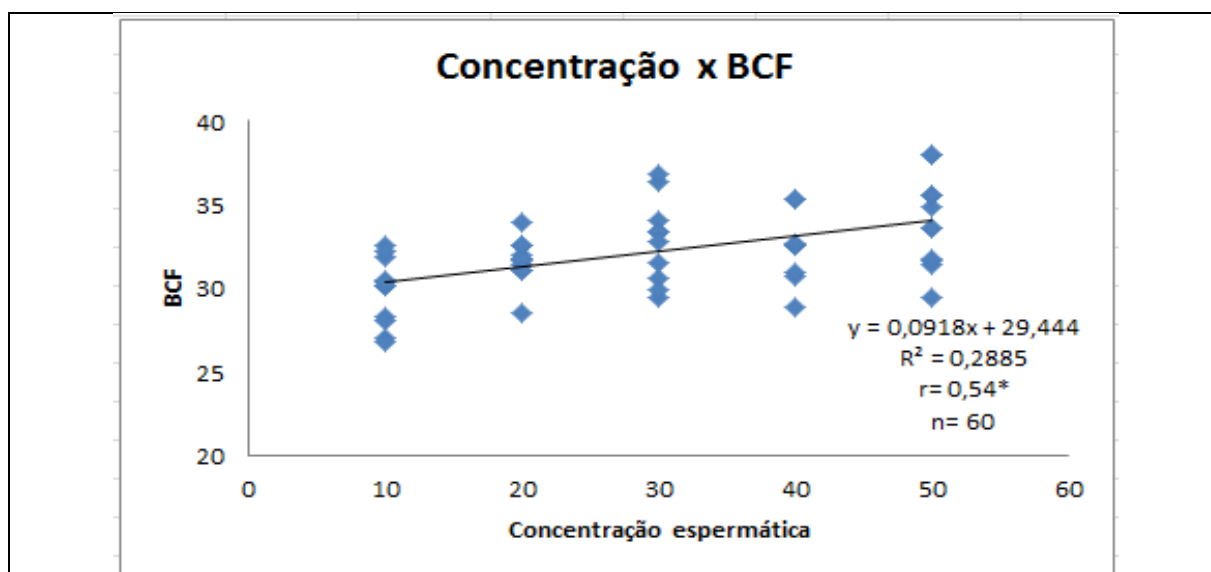


Concentrações espermáticas avaliadas: 10×10^6 ; 20×10^6 ; 30×10^6 ; 40×10^6 e 50×10^6 espermatozoides por palheta de 0,5 mL. TTR/L – Teste de Termorresistência Lento. Diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Correlação a 5%.

A correlação encontrada entre as variáveis estudadas foi considerada positiva e deve-se ao fato de que o aumento da concentração espermática por palheta fez com que houvesse um aumento da motilidade espermática do sêmen bovino no TTR/L.

Na avaliação dos parâmetros de deslocamento dos espermatozoides houve correlação entre a concentração espermática e a BCF, com $r = 0,54$ (gráfico 7).

Gráfico 7: Correlação entre a concentração espermática e a BCF do sêmen bovino criopreservado.



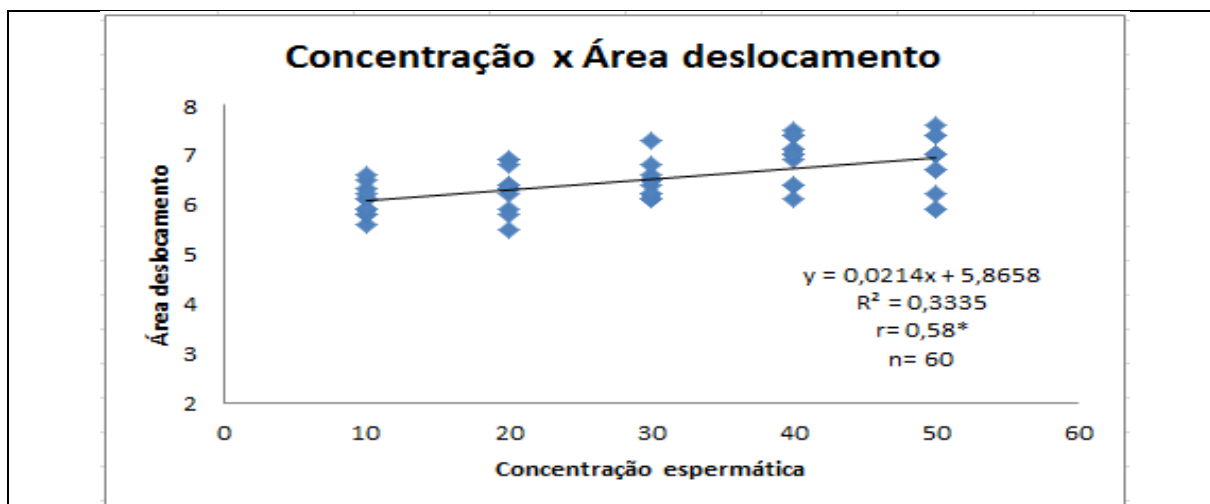
Concentrações espermáticas avaliadas: 10×10^6 ; 20×10^6 ; 30×10^6 ; 40×10^6 e 50×10^6 espermatozoides por palheta de 0,5 mL. BCF - Frequência de batimento flagelar (Hz). Diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Correlação a 5%.

A correlação encontrada entre concentração espermática por palheta e a BCF foi considerada positiva.

A diminuição da velocidade de espermatozoide pode ser causada por uma elevada densidade de extensores, devido à presença de partículas grandes, e que podem causar um decréscimo no BCF, que é um valor útil para a estimativa de alterações macroscópicas no padrão de batida flagelar (CHACUR et al., 2012a).

Houve correlação entre a concentração espermática e a Área de deslocamento dos espermatozoides, o coeficiente de correlação foi $r = 0,58$ e a correlação foi considerada positiva (gráfico 8).

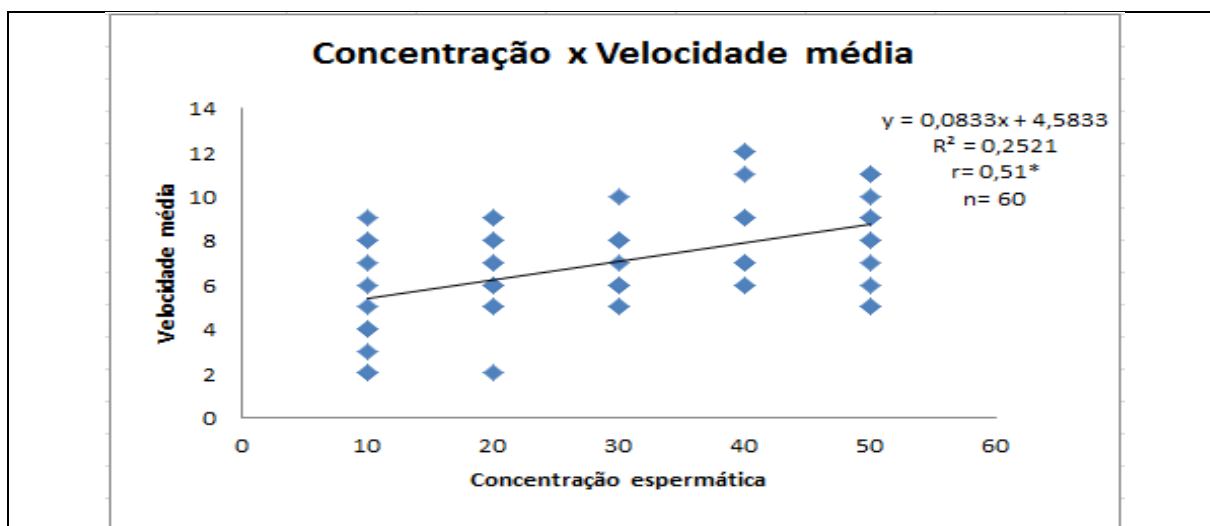
Gráfico 8: Correlação entre a concentração espermática do sêmen bovino criopreservado e a Área de deslocamento dos espermatozoides.



Concentrações espermáticas avaliadas: 10×10^6 ; 20×10^6 ; 30×10^6 ; 40×10^6 e 50×10^6 espermatozoides por palheta de 0,5 mL. Área de deslocamento dos espermatozoides - μm . Diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Correlação a 5%.

Houve correlação entre a concentração espermática e a velocidade média de deslocamento dos espermatozoides, o coeficiente de correlação foi $r = 0,51$ (gráfico 9), e a correlação encontrada entre as variáveis estudadas foi considerada positiva.

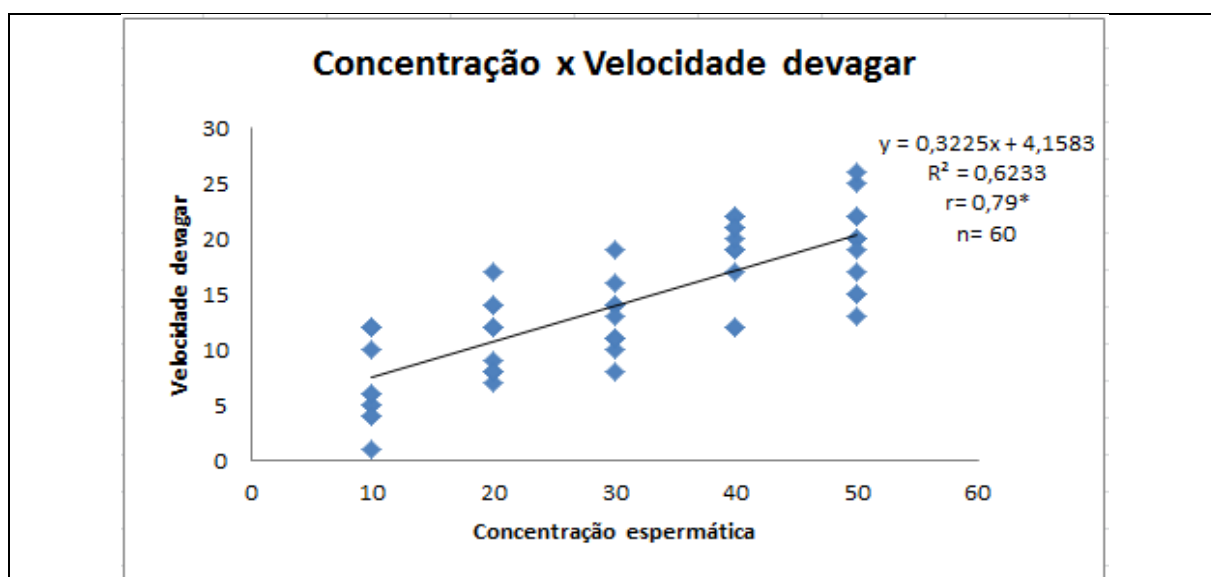
Gráfico 9: Correlação entre a concentração espermática do sêmen bovino criopreservado e a velocidade média de deslocamento dos espermatozoides.



Concentrações espermáticas avaliadas: 10×10^6 ; 20×10^6 ; 30×10^6 ; 40×10^6 e 50×10^6 espermatozoides por palheta de 0,5 mL. Diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Correlação a 5%.

Houve correlação entre a concentração espermática e a velocidade devagar de deslocamento dos espermatozoides, o coeficiente de correlação foi $r = 0,79$ (gráfico 10) e a correlação encontrada foi considerada alta e positiva.

Gráfico 10: Correlação entre a concentração espermática do sêmen bovino criopreservado e a velocidade devagar de deslocamento dos espermatozoides.

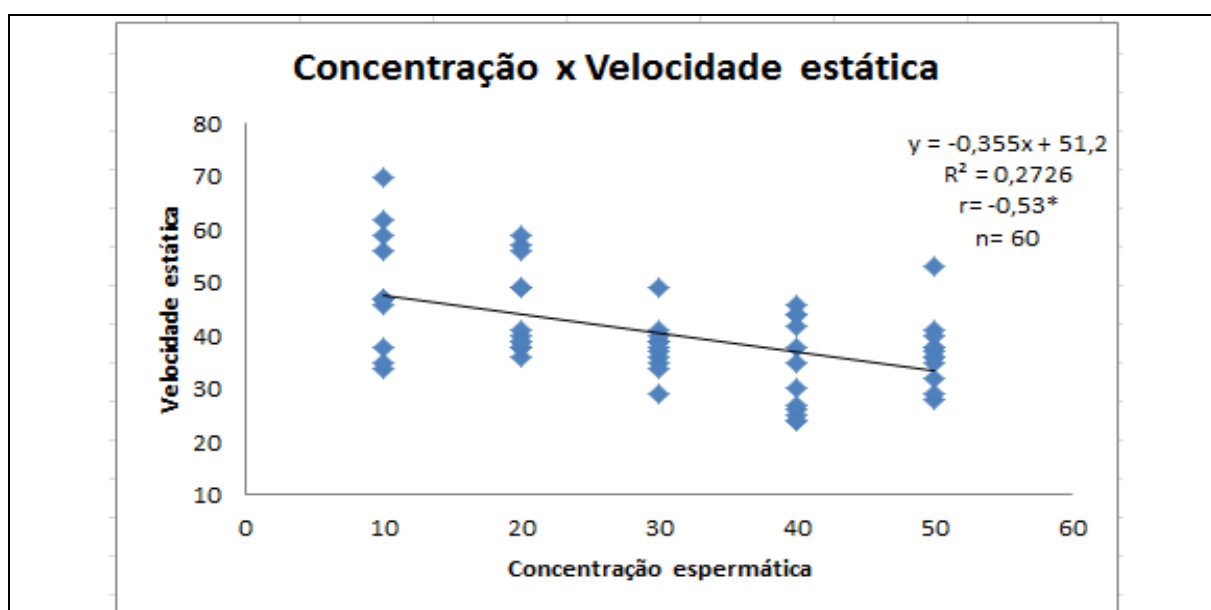


Concentrações espermáticas avaliadas: 10×10^6 ; 20×10^6 ; 30×10^6 ; 40×10^6 e 50×10^6 espermatozoides por palheta de 0,5 mL.

Diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Correlação a 5%.

Houve correlação entre a concentração espermática e a velocidade estática de deslocamento dos espermatozoides, o coeficiente de correlação foi $r = -0,53$ (gráfico 11) e a correlação encontrada foi considerada negativa.

Gráfico 11: Correlação entre a concentração espermática do sêmen bovino criopreservado e a velocidade estática de deslocamento dos espermatozoides.



Concentrações espermáticas avaliadas: 10×10^6 ; 20×10^6 ; 30×10^6 ; 40×10^6 e 50×10^6 espermatozoides por palheta de 0,5 mL.

Diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Correlação a 5%.

Nascimento et al. (2015b), evidenciaram o efeito inerente do touro no sêmen e sobre a fertilização *in vitro* de ovócitos, diferindo significativamente entre touros da mesma raça e partidas do mesmo touro, na taxa de fertilização e na taxa de sobrevivência embrionária ($p < 0,05$), confirmando que o fator touro tem importância determinante na capacidade de fertilização e no crescimento dos embriões até o estágio de blastocisto.

Para García-Álvarez et al. (2014), a falta de explicações sobre a diferença no potencial de fertilidade da partida de sêmen pode ser em função de atributos espermáticos não avaliados. A grande heterogeneidade da população espermática do ejaculado justifica as mudanças no potencial de fertilidade das partidas de sêmen, diferindo entre touros e entre ejaculados do mesmo touro. Além disso, no mesmo ejaculado existem populações com diferentes estruturas, formas e graus de funcionalidades.

CONCLUSÃO

As concentrações espermáticas de 30×10^6 e 40×10^6 de espermatozoides por palheta são as que apresentaram melhor qualidade espermática.

REFERÊNCIAS

- ABUD, C. O. G.; ABUD, L. J.; OLIVEIRA NETO, J. C.; DODE, M. A. N.; SERENO, J. R. B.; MARTINS, C. F. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. **Ciênc. anim. bras.**, v. 15, n. 1, p. 32-37, mar. 2014.
- AITKEN, R.J., GIBB, Z., MITCHELL, L. A., et al. Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. **Biol. Reprod.**, v. 87, n. 5, p. 1-11, 2012.
- AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, p. 5-17, 2014.
- ARRUDA, R. L.; ORRO, I. R.; PASSOS, T. S.; COSTA E SILVA, E. V.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.34, n. 3, p.168-184, 2010.

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

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; SANTOS, G. C.; LEITE, T. G.; OLIVEIRA, L. Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M. P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.39, n.1, p.47-60, jan./mar. 2015.

BERGSTEIN, T.G.; WEISS, R.R.; BICUDO, S.D. Técnicas de análise de sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.38, n.4, p.189-194, out./dez. 2014.

BERTOL, M. A. F.; WEISS, R. R.; FUJITA, A. S.; KOZICKI, L. E.; MACHINSKI, A. C.; ABREU, R.; PEREIRA, J. F. S. Dois diluentes comerciais na criopreservação de espermatozoides do epidídimo de touros. **Ciênc. Rural**, v.44, n.9, set, 2014.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Vet. Med.**, v.53, p.383-391, 1972.

BOSCARATO, A. G.; MARTINS, L. F.; PINHO, R. O.; SILVA, Y. F. R. S.; PAPA, F. O.; MACEDO, G. G. Efeito da adição de ciclodextrina carregada com colesterol sobre a qualidade do sêmen congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.40, n.3, p.105-110, jul./set. 2016.

CAMPANHOLI, S. P.; MONTEIRO, F. M.; MERCADANTE, M. E. Z.; RIBEIRO, E. G. Efeito da remoção de plasma seminal na criopreservação de sêmen de touros *bos indicus* coletados por eletroejaculador utilizando diferentes métodos de separação. **Anais...** VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica. Campinas – SP, ago. 2013.

CARREIRA, J. T.; TREVIZAN, J. T.; KIPPER, B. H.; PERRI, S. H. V.; CARVALHO, I. R.; RODRIGUES, L. H.; SILVA, C.; KOIVISTO, M. B. Impaired protamination and sperm DNA damage in a Nelore bull with high percentages of morphological sperm defects in comparison to normospermic bulls. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.67, n.2, p.417-423, 2015.

CARVALHO, J. O.; SARTORI, R.; LEMES, A. P.; MOURÃO, G. B.; DODE, M. A. N. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. **Pesq. agropec. bras.**, v.44, n.10, p.1346-1351, out. 2009.

CASTELO BRANCO, M. A.; CASTELO BRANCO, Y. N. T. C.; MORAES JUNIOR, F. J.; BARROS, F. N.; BARÇANTE, F. P. S.; CARVALHO, G. M. C.; MELO EVANGELISTA, L. S.; ABREU-SILVA, A. L.; SOUSA FILHO, M. A.; SOUZA, J. A. T. Plasminogen activator inhibitor 1 and Antipain preserve acrosome integrity of bovine spermatozoa during cryopreservation. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.69, n.5, p.1114-1124, 2017.

CAVALERO, T. S.; REIS, J. R.; JACOMINI, J. O. Morfologia espermática de touros nelore, pantaneiro e curraleiro avaliada de amostras coletadas diretamente dos testículos e dos epidídimos. **Horizonte Científico**, v.9, n.2, p. 1-24, dez. 2015.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. de; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; SANTOS, F. B. dos; ALVES, M. B. R.; OLIVEIRA, B. M. M. de. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.41, n.1, p.40-45, jan./mar. 2017.

CHACUR, M. G. M.; DIAS, H. S.; PAPA, P. M.; PAPA, F. O.; MELO-ONÃ, C. M. Effect of refrigeration systems upon frozen bull sperm viability assessed by computer-assisted sperm analysis and fluorescent probes. **Semina: Ciênc. Agrár.**, v. 33, n. 5, p. 1923-1930, set./out. 2012a.

CHACUR, M. G. M.; DIAS, H. S. D.; PAPA, F. O.; LOUVISON, B. A.; CALESCO, M. M.; PAPA, P. de M. Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino. **Vet. e Zootec.**, v.19, n.1, p.346-355, mar. 2012b.

CHACUR, M. M. G.; REIS, J. D. A. dos; TAVARES, L. S.; SANCHES, K.; GUABERTO, L.; ALVES, V. C.; OBA, E.; RAMOS, A. A. Influência das épocas do ano na morfometria testicular e epididimária, características do sêmen e proteínas do sêmen em SDS-PAGE em zebus e taurinos. **Acta Sci. Vet.**, v. 42, n.1, p.1-7, jan. 2014.

CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, v.64, p.457-468, 2005.

COJKIĆ, A.; DIMITRIJEVIĆ, V.; SAVIĆ, M.; JEREMIĆ, I.; VUKOVIĆ, D.; ČOBANOVIĆ, N.; OBRADOVIĆ, S.; PETRUJKIĆ, B. T. The correlation between selected computer assisted sperm analysis parameters and bull fertility. **Veterinarski Arhiv.**, v.87, n.2, p.129-137, 2017.

CONTRI, A.; VALORZ, C.; FAUSTINI, M.; WEGHER, L.; CARLUCCIO, A. Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.74, p. 424-435, 2010.

DALTON, J. C. **Semen quality factors associated with fertility. Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle – Northwest.** Department of Animal and Veterinary Science University of Idaho, Caldwell Research and Extension Center, p. 265-281, set./out. 2011.

DIAS, J. C.; ANDRADE, V. J.; MARTINS, J. A. M. et al. Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.43, n.1, p.53-59, 2008.

DUARTE JÚNIOR, M. F.; ZERVOUDAKIS, L. K. H.; ZERVOUDAKIS, J. T.; NICHI, M.; BERTOLLA, R. P.; TSUNEDA, P. P.; SENRA E SILVA, L. E.; WINGERT, F. M.; MARINHO, W. A. dos S. Avaliação do tocoferol no congelamento do sêmen bovino e nas taxas de prenhez após inseminação artificial em tempo fixo. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 22, n. 2, p. 114-118, abr./jun. 2015.

EL-SHAHAT, K. H.; TAYSSER, M. I.; BADR, M. R.; ZAKI, K. A. Effect of oviduct and follicular fluids on ram sperm capacitation and acrosome reaction in vitro. **J. Vet. Sci. & Medicine**, v. 6, p. 57 – 62, jan. 2018.

EMERICK, L. L.; DIAS, J. C.; VALE FILHO, V. R. do; SILVA, M. de A. e; ANDRADE, V. J. de; LEITE, T. G.; MARTINS, J. A. M. Avaliação da Integridade de Membrana em Espermatozoide Bovino Criopreservado para Prever o Índice de Prenhez. **Ciênc. Anim. Bras.**, v.12, n.3, p. 536-546, jul./set. 2011.

FELIPE-SILVA, A. S.; VALE FILHO, V. R.; FERREIRA, M. B. D.; CORREA, G. S. S.; SILVA, M. A.; VERAS, M. M.; ANDRADE, V. J. Efeitos do diluidor na viabilidade espermática pós-criopreservação em tourinhos da raça Gir Leiteiro aos 25 meses de idade, pré-selecionados pela classificação andrológica por pontos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.1, p.81-86, 2011.

FRASER, L.; STRZEZEK, J.; KORDAN, W. Effect of freezing on sperm nuclear DNA. **Reprod. Domest. Anim.**, v.46, p.14–7, 2011.

FRENEAU, G. E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.35, n.2, p.160-170, abr./jun. 2011.

FRENEAU, G. E.; PUOLI, J. R.; ARNHOLD, E. Evolução após quatro anos de aplicação da capacidade andrológica por pontos (CAP) em touros Nelore e estudo da relação com a prenhez em estação de acasalamento. **Ciênc. anim. bras.**, v.18, p.1-12, 2017.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; DEL OLMO, E.; JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ANEL-LÓPEZ, L.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support in vitro capacitation and fertilisation. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.26, p.725-732, 2014.

GUERRA NETO, J. de O.; CHACUR, M. G. M.; CALDATO, F. A.; SILVA, A. A. da; CASTILHO, C. Correlação da Morfologia Espermática em Programas de Inseminação Artificial Convencional em Novilhas e Vacas da Raça Nelore. **Colloq. Agrariae**, v. 8, n.2, p. 57-64 jul/dez. 2012.

GÜRLER, H.; CALISICI, O.; BOLLWEIN, H. Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. **Anim. Reprod. Sci.**, v.155, p.99–105, 2015.

GÜRLER, H.; MALAMA, E.; HEPPELMANN, M.; CALISICI, O.; LEIDING, C.; KASTELIC, J. P.; BOLLWEIN, H. Efeitos da criopreservação na viabilidade espermática, síntese de espécies reativas de oxigênio e danos no DNA de espermatozoides bovinos. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 562-571, jul. 2016.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. **Vet. and Zootec.**, v. 39, p. 1-8, 2001.

JOHNSTON, S.D.; SATAKE, N.; ZEE, Y.; LOPEZ-FERNANDEZ, C.; HOLT, W.V.; GOSALVEZ, J. Osmotic stress and cryoinjury of koala sperm: an integrative study of the plasma membrane, chromatin stability and mitochondrial function. **Reproduction**, v. 143, p. 787–97, 2012.

KAKA, A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; YIMER, N.; KHUMRAN, A. M.; SARSAIFI, K.; BEHAN, A. A.; KAKA, U.; EBRAHIMI, M. α -Linolenic acid supplementation in BioXcell® extender can improve the quality of post-cooling and frozenthawed bovine sperm. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 153, p. 1-7, fev. 2015.

KARUNAKARAN, M.; DEVANATHAN, T. G. Evaluation of bull semen for fertility-associated protein, in vitro characters and fertility. **J. Appl. Anim. Res.**, v. 45, n. 1, p. 136-144, 2017.

LEITE, P. A.; SCHREDERA, G. G.; ALMEIDA, C. L. R. de; ZÚCCARIA, C. E. S. N.; COSTA E SILVA, E. V. da. Criopreservação do Sêmen Bovino. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 13, n. 4, p. 279-286, 2011.

LEMMA, A. **Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility**. In: MANAFI, M. Artificial insemination in farm animals. Croatia: InTech, 2011. Cap.12, p.191-216.

LIMA, F. P. C.; XAVIER, P. R.; BERGMANN, J. A. G.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Perímetro escrotal e características seminais de touros da raça Nelore selecionados para precocidade sexual. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.6, p.1603-1608, 2013.

LUZ, H. K. M.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G. da; FIGUEIREDO, J. R. de; RODRIGUES, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Sci. Vet.**, v.39, n.2, p.1-13, 2011.

MADEIRA, E. M.; BIANCHI, I.; VIEIRA, M. B.; SCHNEIDER, A.; SEVERO, N. C.; PFEIFER, L. F. M.; CORRÊA, M. N. Avaliação de diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de touros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.2, p.415-420, 2013.

MARINHO, W. A. S.; HATAMOTO-ZERVOUDAKIS, L. K.; ZERVOUDAKIS, J. T.; ARGUELLO, F. A. P. B.; TSUNEDA, B. H.; DUARTE JUNIOR, M. F.; TSUNEDA, P. P.; BARBOSA, E. A. Características seminais e de membrana espermática em touros suplementados com tocoferol. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, v.17, n.2, p.322-330, abr./jun., 2016.

MARTÍ, J. I.; APARICIO, I. M.; GARCÍA-HERREROS, M. Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. **Theriogenology**, v.75, p.473-481, 2011.

MARTINS, L. F.; PINHO, R. O.; GUIMARÃES, J. D.; MACEDO, G. G.; BOSCARATO, A. G.; RODRIGUES, D. P.; DIAS, S. H. Utilização de diferentes volumes de sêmen na realização do teste hiposmótico em touros adultos da raça Nelore. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, v.18, n.1, p. 5-10, jan./mar. 2015.

MELO EVANGELISTA, L. S.; CARVALHO, Y. N. T.; CASTELO BRANCO, M. A.; MOTA, L. H. C. M.; BARÇANTE, F. P. S.; SOUZA, I. O. T.; CÂMARA, T. S.; SOUZA, J. A. T. Avaliação in vitro do sêmen criopreservado de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.68, n.3, p.651-657, 2016.

MONTESINOS, I. S.; CARVALHO NETO, J. O.; DODE, M. A. N.; FIORAVANTI, M. C. S.; SERENO, J. R. B. **Avaliação espermática de sêmen criopreservado de touros da raça curraleira em banco de germoplasma: dados preliminares.** EMBRAPA. 2015.

MORRIS, G. J.; ACTON, E.; MURRAY, B. J.; FONSECA, F. Freezing injury: The special case of the sperm cell. **Cryobiology**, v. 64, p. 71-80, 2012.

NASCIMENTO, P. S.; CHAVES, M. S.; SANTOS FILHO, A. S.; GUIDO, S. I.; MOURA, M. T.; BARTOLOMEU, C. C. Efeitos da sexagem sob as características espermáticas de touros 5/8 Girolando. **Ciênc. vet. tróp.**, v.18, n. 2, p. 265-268, mai./ago. 2015a.

NASCIMENTO, P. S.; CHAVES, M. S.; SANTOS FILHO, A. S. dos; GUIDO, S. I.; GUERRA, M. M. P.; BARTOLOMEU, C. C. Produção in vitro de embriões utilizando-se sêmen sexado de touros 5/8 girolando. **Ciênc. anim. bras.** v.16, n. 3, p. 358-368 jul./set. 2015b.

PESH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron.**, 37: 597-612. 2006.

PRADO, R. B.; KOIVISTO, M. B.; CARREIRA, J. T.; PERRI, S. H. V.; RODRIGUES, L. H.; ATIQUÊ NETTO, H.; TORREGROSSA, T. L. G.; VICENTE, W. R. R.; FELICIANO, M. A. R. Efeito da utilização de diferentes diluidores para a produção in vitro de embriões bovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.5, p.1118-1126, 2012.

QUEIROZ, V. L. D.; COSTA FILHO, L. C. C. da; ROSA, L. da S.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA e SILVA, E. V. Sazonalidade na congelabilidade de sêmen bovino. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, v.18, n.1, p. 39-47, jan./mar. 2015.

RODRIGUES, M. P.; TARRAGÓ, O. F. B.; ARRUDA, R. P.; OLIVEIRA, L. Z.; BERTOLLA, R. P.; NICHI, M.; BARNABE, V. H. Perfil oxidativo e funcional de sêmen bovino criopreservado em diferentes estações do ano. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 52, n. 2, p. 134-140, 2015.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia, GO: Colégio Brasileiro de Reprodução, 2005.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; RODRIGUES, L. H.; FRANCHESCHINI, P. H. Proteomics to investigate bull's semen freezability. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 50, n. 1, p. 43-49, 2013.

SAACKE, R. G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. **Theriogenology**, v.70, p.473-478, 2008.

SANTOS, F. B. **Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em vacas de corte**. 2016. 62f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SILVA, E. C. B.; CAJUEIRO, J. F. P.; SILVA, S. V.; SOARES, P. C.; GUERRA, M. M. P. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v.77, n. 8, p. 1722-1726, mai. 2012.

SILVA, N. C.; LEÃO, K. M.; MARQUES, T. C.; SILVA, R. P.; RODRIGUES, M. C. Uso de sêmen fresco e refrigerado em programas de inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas bovinas. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.17; p.2537-2551, 2013.

SILVEIRA, T. S.; SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, S. E. F.; PAULA, T. A. R.; MIRANDA NETO, T.; GUIMARÃES, J. Maturação sexual e parâmetros reprodutivos em touros da raça Nelore criados em sistema extensivo. **R. Bras. Zootec.**, v.39, n.3, p. 503-511, 2010.

SUNDARARAMAN, M. N.; KALATHARAN, J.; THILAK PON JAWAHAR, K.; Computer assisted semen analysis for quantification of motion characteristics of bull sperm during cryopreservation cycle. **Vet. World**, v. 5, p. 723-726, 2012.

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

WEISS, R. R.; TREML, T. E.; ABREU, A. C. M. R.; BERTOL, M. A. F.; KOZICKI, L. E.; BERSTEIN, T. G.; KOCH, M. O. Efeito da dexametasona na fertilidade do touro. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 3, p. 91-98, 2015.

ZÚCCARI, C. E. S. N.; LEITE, P. A.; PASSOS, T. S.; CARRIJO, P. R.; KIEFER, C. Correlação entre métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozoide bovino criopreservado. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.10, n.3, p 678-684 jul/set, 2009.

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após o presente estudo entende-se que é fundamental o uso de métodos adequados de coleta, armazenamento e de criopreservação do sêmen bovino, para garantir a qualidade e obter maiores índices de fertilidade nos rebanhos.

Para que a criopreservação ocorra de forma eficiente é necessário que a diluição seja realizada de forma correta, o que resultará num sêmen de melhor qualidade e na maior quantidade de doses inseminantes, permitindo a inseminação de maior número de fêmeas, proporcionando o melhoramento genético e tornando o processo mais lucrativo.

Utilizar sêmen com qualidade é imprescindível para a fertilidade e sucesso da reprodução de bovinos.

Vários pesquisadores tem buscado determinar quais são as causas da falha na fertilidade de partidas de sêmen bovino, entretanto, são divergentes quanto às características espermáticas são consideradas isoladamente. Acredita-se que quanto mais características espermáticas são avaliadas numa partida de sêmen, maior a acurácia na identificação das partidas com possível redução no potencial de fertilidade. Assim, a aplicação de técnicas adicionais para avaliar partidas de sêmen, antes da comercialização, contribui para melhorar o controle de qualidade e reduz o impacto sobre a fertilidade e produtividade do rebanho.

No processo da fecundação, para melhor estimar o papel dos espermatozoides, busca-se avaliar seus vários atributos para obter maior acurácia na estimação da sua capacidade fecundante. Esses testes laboratoriais têm sido muito úteis para excluir dos programas reprodutivos os touros considerados com baixo potencial fecundante, porém, ainda não é possível apontar dentre os férteis quais são os que podem proporcionar maiores taxas de prenhez. Existem hoje, várias técnicas para avaliação dos espermatozoides, que podem ser usadas separadamente ou em associação, principalmente aquelas que possuem alta correlação com a fertilidade *in vivo*, o que é muito importante nas pesquisas que avaliam os melhores procedimentos no processamento do sêmen bovino, assim, a variação observada entre resultados ocorre devido à aplicação da seleção *in vitro* das doses de sêmen e de seu desempenho a campo.

Os espermatozoides são células complexas e estão sujeitos a ação de múltiplos fatores para que possam exercer seu papel natural na reprodução animal e

devido a falhas ocorridas nos métodos tradicionais de avaliação apresentam correlações baixas entre a qualidade das amostras seminais e os índices de fertilidade nos programas de IA em bovinos. A combinação dos resultados de vários métodos de avaliação seminal tem agregado maior valor aos testes *in vitro*, indicando avanços no controle da qualidade das amostras seminais. Porém, essa avaliação dos índices de concepção observados a campo representa uma barreira de difícil transposição, envolvendo diversos fatores inerentes ao touro e aos laboratórios de processamento de sêmen, necessitando de uma padronização das técnicas e tecnologias empregadas para conferir objetividade, repetibilidade e acurácia às avaliações do sêmen bovino criopreservado.

Sabendo que o processamento do sêmen (congelamento e descongelamento) reduz significativamente a qualidade do sêmen em relação a quase todas as características de movimento espermático, o CASA, por fornecer características de movimento estatístico adequadas na velocidade, comportamento da cabeça e padrão de natação dos espermatozoides permite a avaliação objetiva espermática. Como as variáveis do CASA são conhecidas por ser útil na previsão da fertilidade do sêmen, a adoção da técnica CASA poderia ajudar na melhor avaliação da qualidade do sêmen congelado para melhorar a fertilidade na IA. Entretanto, ainda são necessárias pesquisas adicionais sobre como relacionar as variáveis do CASA com a fertilidade do sêmen bovino.