

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**“INFLUÊNCIA DO SÊMEN HOMOSPÉRMICO, HETEROSPÉRMICO E
DO PLASMA SEMINAL HETERÓLOGO SOBRE OS PARÂMETROS
ESPERMÁTICOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO*”**

RENATA SANCHES CALEGARI

Botucatu-SP
Dezembro 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**“INFLUÊNCIA DO SÊMEN HOMOSPÉRMICO, HETEROSPÉRMICO E
DO PLASMA SEMINAL HETERÓLOGO SOBRE OS PARÂMETROS
ESPERMÁTICOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO*”**

RENATA SANCHES CALEGARI

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária (Área de Concentração: Reprodução Animal) para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Eunice Oba
Coorientador: Prof. Dr. Aécio Martins
Júnior

Botucatu-SP
Dezembro 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Calegari, Renata Sanches.

Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro* / Renata Sanches Calegari. – Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Eunice Oba

Coorientador: Alicio Martins Júnior

Capes: 50504002

1. Bovino – Reprodução. 2. Fertilização *in vitro*. 3. Sêmen.

Palavras-chave: Análises *in vitro*; Bovino; Parâmetros espermáticos; Plasma seminal; Sêmen homospérmico; Sêmen heterospérmico.

NOME DA AUTORA: Renata Sanches Calegari

TÍTULO: “INFLUÊNCIA DO SÊMEN HOMOSPÉRMICO, HETEROSPÉRMICO E DO PLASMA SEMINAL HETERÓLOGO SOBRE OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO*”

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alicio Martins Júnior (Presidente e Coorientador)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal
FOA – UNESP – Araçatuba –SP

Prof. Dr. Joao Carlos Pinheiro Ferreira (Membro)
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu –SP

Prof^ª. Dr^ª. Valquíria Hipólito Barnabé (Membro)
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ – USP – São Paulo–SP

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo (Membro)
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu–SP

Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur (Membro)
Departamento de Reprodução Animal
UNOESTE – Presidente Prudente - SP

DATA DE DEFESA: 2 de dezembro de 2011

*À Deus,
no qual, muitas vezes em momentos de fraquezas
eu busquei e consegui forças para superar,*

*Aos meus amados pais, Alberto e Áurea,
pelo apoio, pelo incentivo, pela força,
pela educação, pelo amor incondicional,
que me dirigiram pela vida e me deram as asas que
precisava para voar,*

*Aos meus irmãos, Rô e Tico, Tia Leila
e cunhadas Ana e Paty,
pela amizade e cumplicidade
nas alegrias e dificuldades,*

*Ao meu amado sobrinho, Renatinho, que nos traz muitas
felicidades e alegrias,*

Dedico

Aos meus amados avós, Renato e Ada,

À minha eterna “irmã” amiga Denise,

Ao Paulinho,

In memoriam

Ofereça

Ao Prof. Dr. Aécio Martins Júnior

*Agradeço sua amizade, a qual
gentilmente me permitiu desfrutar.*

*Agradeço sua energia, que positivamente
muitas batalhas você me ajudou a ganhar.*

*Agradeço sua força, que bravamente
conseguiu me emprestar.*

*Agradeço ao seu coração, todo carinho
que deu, encorajou e incentivou...*

*pela formação profissional,
pelo aprendizado, pelo apoio incondicional,
pela paciência, e orientação suprema para
a realização deste trabalho,*

A você o meu muito obrigada!!!

Um agradecimento especial

À Prof^a. Dra. Eunice Oba, pela orientação, e compreensão na realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Alicio Martins Júnior, pela co-orientação, incentivo, dedicação, preocupação e colaboração imensurável na realização deste trabalho.

Ao curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da UNESP, campus de Botucatu, pela oportunidade e aperfeiçoamento científico.

Ao amigo Heitor, pela amizade, constante ajuda e presteza na realização deste trabalho.

Aos Professores, Alcides Amorim e Silvia Helena Venturioli Perri, pela inestimável colaboração na realização das análises estatísticas.

Aos colegas, Diego, André e Camila pela colaboração no desenvolvimento do projeto.

A Silvana Cassia Paulan pelo auxílio no projeto.

A todos os meus amigos que sempre me incentivaram e me apoiaram, em especial, ao José Luis.

Ao Haras das Mangueiras que me proporcionou tranquilidade e concentração para escrever grande parte da minha tese.

*À Central de Inseminação Artificial VR,
Araçatuba, SP, pela oportunidade oferecida.*

*À todos os animais do frigorífico que contribuíram
para a realização do meu projeto.*

*À todas as pessoas, que contribuíram de alguma
forma nesse trabalho e sempre estiveram torcendo por mim.*

Agradeço

*“Percebi que os remédios nem sempre vinham em frascos,
mas também em quatro patas”*

Willian Thomas

LISTA DE TABELAS

TRABALHO 1

Tabela 1 - Estatística descritiva (média e desvio padrão) das variáveis espermáticas pré congelção para os grupos homospérmicos e touros.....	57
Tabela 2 - Valores da média e desvio padrão das variáveis da cinética espermática para os grupos heterospérmico e homospérmicos e touros.....	58
Tabela 3 - Valores da média e desvio padrão das variáveis da cinética espermática para os grupos heterospérmico e homospérmicos e touros.....	59
Tabela 4 - Valores da média e desvio padrão das variáveis da cinética espermática para os grupos heterospérmico e homospérmicos e touros.....	60
Tabela 5 - Valores da média e desvio padrão da rapidez do espermatozóide e da integridade de membrana plasmática para os grupos heterospérmico e homospérmicos e touros.....	61
Tabela 6 - Coeficiente de correlação entre as variáveis da análise computadorizada do sêmen.....	62
Tabela 7 - Influência do sêmen homospérmico e heterospérmico sobre o desenvolvimento embrionário in vitro.....	63

TRABALHO 2

Tabela 1 -	Estatística descritiva (média e desvio padrão) das variáveis espermáticas pré congelação para os grupos homospérmicos e touros.....	101
Tabela 2 -	Valores da média e desvio padrão das variáveis da cinética espermática para os grupos heterospérmico e homospérmicos e touros.....	102
Tabela 3 -	Valores da média e desvio padrão das variáveis da cinética espermática para os grupos heterospérmico e homospérmicos e touros.....	103
Tabela 4 -	Valores da média e desvio padrão das variáveis da cinética espermática para os grupos heterospérmico e homospérmicos e touros.....	104
Tabela 5 -	Valores da média e desvio padrão da rapidez do espermatozóide e da integridade de membrana plasmática para os grupos heterospérmico e homospérmico.....	105
Tabela 6 -	Coefficiente de correlação entre as variáveis da análise computadorizada do sêmen.....	106
Tabela 7 -	Influência do sêmen homospérmico e do sêmen reconstituído com PS heterólogo sobre o desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	107
Tabela 8 -	Resultados da média ($\pm$ DP) para a testosterona plasmática e proteína total do plasma seminal de touros da raça Nelore.....	108

Tabela 9 -	Média e desvio padrão das variáveis de cinética espermática e integridade de membrana plasmática, conforme os padrões eletroforéticos das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore.....	109
-------------------	---	-----

Tabela 10 -	Média e desvio padrão das mensurações de proteína total do plasma seminal e de testosterona plasmática, conforme o padrão eletroforético das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore.....	110
--------------------	--	-----

LISTA DE FIGURAS

TRABALHO 1

- Figura 1** - Embriões do grupo heterospérmico, aos estágios de Bl, Bx e Bec, às 192 hpi (40x).....64
- Figura 2** - Embriões do grupo homospérmico (HoA), aos estágios de Bl, Bx, Be e Bec, às 192 hpi (40x).....65
- Figura 3** - Embriões do grupo homospérmico (HoM), aos estágios de Bl, Bx, Be e Bec, às 192 hpi (40x).....66

TRABALHO 2

- Figura 1-** Eletroferograma dos padrões de proteínas do plasma seminal de touros portadores de sêmen de alta e média congelabilidade, da raça Nelore, fracionadas em eletroforese vertical (SDS-PAGE 10%).....111

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

>: Maior

<: Menor

%; Porcento

°C: Grau Celsius

µg: Micrograma

mg: Miligrama

ng: Nanograma

µL: Microlitro

kDa: Kilo dalton

ALH: Amplitude do deslocamento lateral de cabeça

CASA: Análise computadorizada do movimento espermático

DM: Defeitos maiores

Dm: Defeitos menores

FIV: Fertilização *in vitro*

IA: Inseminação artificial

IATF: Inseminação artificial em tempo fixo

IMP: Integridade de membrana plasmática

LH: Hormônio luteinizante

LIN: Linearidade espermática

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

M: Motilidade

MP: Motilidade progressiva

MT: Motilidade total

N₂: Nitrogênio

PE: Padrão eletroforético

PI: Iodeto de propídeo

PIV: Produção *in vitro* de embriões

PS: Plasma seminal

PT: Proteína total

RAP: Espermatozóide com movimento rápido

TP: Testosterona plasmática

TRIS: Tris (hidroximetil-aminometano) gema de ovo-frutose

SH: Sêmen heterospérmico
V: Vigor
VAP: Velocidade média
VCL: Velocidade curvilinear
VSL: Velocidade Linear
ZP: Zona pelúcida

SÚMARIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
 1 INTRODUÇÃO	 1
 2 REVISÃO DE LITERATURA	 4
2.1. Sêmen.....	5
2.1.1. Espermatozóide.....	5
2.1.2. Plasma seminal	6
2.2. Centrifugação do sêmen e remoção do plasma seminal.....	9
2.3. Sêmen heterospermico.....	12
2.4. Avaliação espermática.....	15
2.4.1. Avaliação computadorizada de sêmen (CASA).....	17
2.4.2. Análise da integridade de membrana plasmática (IMP).....	21
2.5. Avaliação do padrão eletroforético de proteínas do plasma seminal.....	23
2.6. Dosagem de testosterona	25
2.7. Produção de embriões <i>in vitro</i> (PIV).....	26
 3 TRABALHOS CIENTÍFICOS	 30
Trabalho.1 “Influência do sêmen heterospermico e homospermico congelado, a partir de amostras com alta e média congelabilidade, sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos <i>in vitro</i> ”.....	31
Trabalho.2 “Avaliação do sêmen heterólogo e homólogo, produção de embriões <i>in vitro</i> e concentração de testosterona plasmática em touros da raça Nelore portadores de sêmen de alta e média congelabilidade”.....	67
 4 CONCLUSÕES GERAIS	 112
 5 BIBIOGRAFIA	 115
 Apêndices.1	 131

CALEGARI, R.S. “**Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro***”. Botucatu, 2011. 166p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Este estudo foi dividido em dois experimentos. No exp. 1, investigou-se a influência do sêmen congelado heterospérmico e homospérmico de touros Nelore sobre o movimento de espermatozóides (ME), integridade da membrana plasmática (IMP) e produção de embriões *in vitro* (PIV). No exp. 2, a substituição de plasma seminal (PS) de touros com sêmen de média congelabilidade (grupo homospérmico, HoM) por PS heterólogo de touros de alta congelabilidade (grupo homospérmico, HoA), foram avaliados através do ME, IMP, PIV, proteína total (PT), concentração de testosterona plasmática (TP) e padrão eletroforético das proteínas do plasma seminal (PE). O plasma seminal heterólogo (grupo PSH) foi composto pela mistura de PS de touros HoA com espermatozóides de touros HoM. As amostras seminais de oito touros foram classificadas, com base em avaliações anteriores. Para o exp. 1, não foi observada diferença significativa para o ME, IMP e PIV entre os grupos, mas, foi observada entre os touros, independentemente do grupo. No exp. 2, não houve diferença, para o ME, PT, TP e embriões produzidos entre os grupos, entretanto, maior número de membranas plasmáticas intactas ($P<0,05$) foi encontrado no grupo HoA, bem como para a taxa de clivagem ($P<0,05$) no grupo PSH. Sete padrões de proteínas (20 a 25 frações) foram detectados no PS. A concentração de PT e TP variou pouco, quando comparada com o PE. Concluindo, o sêmen heterospérmico não melhorou nenhuma característica espermática nem aumentou a produção de embriões *in vitro*, no entanto, o PSH somente mostrou efeito benéfico sobre a taxa de clivagem. Agradecimentos: Central VR e frigorífico Frig, Araçatuba, SP, Brasil.

Palavras chave: sêmen homospérmico; sêmen heterospérmico; plasma seminal; bovino; parâmetros espermáticos; análises *in vitro*

CALEGARI, R.S. **Influence of homospermic and heterospermic bull semen and heterologous seminal plasma on sperm parameters and in vitro bovine embryo production.** Botucatu, 2011. 166 p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

This study was divided into two experiments. In exp.1, the influence of frozen heterospermic and homospermic bull semen on sperm motion (SM), plasma membrane integrity (PMI) and in vitro embryo production (IVP) were investigated. In exp.2, the replacement of seminal plasma (SP) of bulls with medium semen freezability (homospermic group, MH) by heterologous SP of bulls with high freezability (homospermic group, HH), as evaluated for SM, PMI, IVP, total protein (TP), plasma testosterone level (PT), and electrophoretic profile of plasma seminal protein (EP). The heterologous seminal plasma (HSP) group consisted of a mixture of SP of bull HH with spermatozoa of bull MH. Sperm samples from 8 Nellore bulls were classified based on previous evaluations. In exp. 1, no significant difference was observed for SM, PMI, and IVP among groups, but it was observed among bulls, regardless of group. In exp.2, there was no difference for SM, TP, PT, and yielded embryos among groups, but more intact plasma membranes ($P<0.05$) were found in group HH as well as for cleavage rate ($P<0.05$) in group HSP. Seven protein profiles (20 to 25 protein fractions) were detected in SP. Level of TP and PT varied little when compared to the seminal protein profile. In conclusion, heterospermic semen did not improve any sperm characteristic nor enhanced in vitro embryo production, however, HSP only showed beneficial effect on cleavage rate. Acknowledgement: VR Insemination Station and FRIG slaughterhouse, Araçatuba, SP, Brazil.

Keywords: homospermic; heterospermic; seminal plasma; heterologous semen; bovine

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A pecuária tem uma grande importância econômica para o Brasil, principalmente a pecuária de corte, visto que o país tem o segundo maior rebanho do mundo, sendo o maior exportador de carne bovina do mundo (United States Department of Agriculture, 2011). Devido à sua grande extensão territorial, tem potencial para incrementar ainda mais a produtividade de carne e leite, sendo que o aumento da mesma pode ser obtido com o emprego de biotecnologias que contribuem para o aperfeiçoamento do sistema produtivo, pois através de inseminação artificial e transferência de embriões estas técnicas maximizam a produção e a difusão, respectivamente, do material genético de touros e vacas superiores, os quais poderão transmitir características para elevado ganho de peso, produção de leite e melhor qualidade de carcaça.

A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica reprodutiva de custos mais acessíveis e que serve como ferramenta para o melhoramento genético do rebanho. Todavia, para sua aplicação ampla é indispensável o uso do sêmen congelado.

Desde o primeiro sucesso de congelação de sêmen de touro, relatado por Polge et al. (1949), poucos avanços foram feitos e incorporados ao procedimento de criopreservação de espermatozóides, na tentativa de se abolir a gema de ovo em meios destinados à preservação de sêmen de touro (MOUSSA et al., 2002; THUN et al., 2002; AIRES et al., 2003; AMIRAT et al., 2004).

A capacidade de uma fêmea bovina em produzir uma cria saudável por ano é, sem dúvida, uma das características mais importantes em qualquer processo de seleção de animais para reprodução e, conseqüentemente, melhoramento genético. Contudo, o mérito genético e a fertilidade do touro tem um grande impacto sobre o desempenho do rebanho (LOWMAN et al., 1994).

O aumento dos índices de concepção tem sido relatado, quando inseminações com sêmen heterospermico (SH) são utilizadas, em bovinos e outras espécies (SACKE, 1983; BERGER, 1995; FLINT et al., 2003).

Para disponibilizar aos pecuaristas tecnologia que permita aumentar a taxa de concepção, diminuindo o número de vacas não gestantes, e trabalhar com grupos de touros específicos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA aprovou a regulamentação para a produção e comercialização de SH de ruminantes, conforme Instrução Normativa, nº. 32, de 23 de agosto de 2007, a qual autoriza a

mistura de até cinco ejaculados de diferentes animais para a produção de doses de sêmen, com finalidade comercial. No entanto, praticamente todo SH comercializado nos pais, ainda, provém de centrais de inseminação artificial estrangeiras, sendo que a ABS Pecplan (2010) relata um aumento de 6 a 9% nas taxas de concepção. Contudo, o MAPA, diferente do especificado para o SH, ainda não regulamentou a adição de plasma seminal (PS) heterólogo em amostras seminais.

Portanto, este trabalho foi desenvolvido com objetivo de:

- 1) comparar o sêmen heterospermico e homospermico de amostras seminais de alta e média congelabilidade, através da avaliação dos parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*, mediante análise computadorizada (CASA) e de integridade de membrana plasmática (IMP);
- 2) comparar o sêmen homospermico (a partir de amostras de alta e média congelabilidade) com o “pellet” de espermatozoides reconstituído com plasma seminal heterólogo (PSH), através da avaliação dos parâmetros espermáticos, mediante análise computadorizada (CASA) e de integridade de membrana plasmática (IMP);
- 3) verificar e comparar a concentração plasmática de testosterona e de proteína total do PS de touros portadores de sêmen de alta e média congelabilidade;
- 4) determinar o padrão eletroforético das proteínas do plasma seminal de touros com sêmen de alta e média congelabilidade, comparando-os com os resultados dos parâmetros espermáticos (CASA e IMP) e da mensuração das concentrações de PT e de testosterona plasmática, da raça Nelore;
- 5) verificar possíveis correlações entre as variáveis espermáticas avaliadas através da técnica CASA.

REVISÃO DE LITERATURA

CALEGARI, R.S. “Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*”

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sêmen

O sêmen é uma suspensão celular líquida composto por células espermáticas e secreções das glândulas sexuais anexas (HAFEZ, 2004). O plasma seminal (PS) atua como meio de transporte e de proteção para os espermatozóides, desde a ejaculação, até a fertilização (KRAUS et al., 2005). As proteínas estão presentes na forma de complexos associados, possuindo composição e tamanho específicos para cada espécie.

Para que o espermatozóide seja considerado viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas normais. A presença de membranas íntegras é pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo de fertilização ocorram, tais como: ligação de proteínas seminais na superfície dos espermatozóides, durante a ejaculação; interação de proteínas de membrana dos espermatozóides com células epiteliais do oviduto; capacitação espermática; reconhecimento dos gametas; ligação entre os gametas; reação acrossômica; penetração do espermatozóide na zona pelúcida e fusão dos gametas (YANAGIMACHI, 1994; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 1997; STRZEZEK et al., 2005).

2.1.1. Espermatozóide

O espermatozóide é produzido no interior dos túbulos seminíferos pela divisão e transformação das células tronco germinativas em espermatozóides, por um processo chamado espermatogênese (CHENG, 2004), sendo formados por dois componentes principais, a cabeça e o flagelo ou cauda, com uma membrana plasmática que recobre toda a célula (MORTIMER, 1997). As membranas (plasmática, nuclear, acrossomal e mitocondrial) da célula espermática são constituídas por agregados de lipídios e proteínas, construídas na espermatogênese e modificadas durante o trânsito e armazenamento no epidídimo, à ejaculação. A função das membranas é determinada pela interação de seus vários componentes, desse modo, algum evento que a modifique, pode alterar sua função (GADELLA, 2000).

A membrana plasmática é formada basicamente por uma bicamada lipídica com proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados

em um mosaico fluido, cujos componentes estão agregados dentro de regiões específicas e domínios (O'BRIEN, 1994).

Toda a característica estrutural especializada do espermatozóide está voltada para sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozóide para o oócito, a qual propicia a união dos pró-núcleos para formar o zigoto (EDDY; O'BRIEN, 1994). Dessa forma, a função principal da cabeça do espermatozóide é a liberação de uma série haplóide de cromossomos para o oócito, enquanto que do flagelo é promover a motilidade da célula, para permitir sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e penetração através da zona pelúcida (MORTIMER, 1997).

2.1.2. Plasma seminal

O PS é uma mistura complexa de secreções originadas dos testículos, epidídimos e glândulas sexuais anexas. Estas secreções contêm diversos polipeptídios, sendo que alguns se ligam aos espermatozoides, desempenhando um importante papel na sua habilidade fertilizante (MANJUNATH et al., 1993), prevenindo a capacitação e a reação acrossômica (OLIPHANT et al., 1985). Essas proteínas têm sido descritas como fatores decapacitantes (CHANG, 1957) e devem ser removidas ou modificadas antes que ocorra a reação acrossomal (LANGLAIS; ROBERTS, 1985).

Além de facilitar o trânsito dos espermatozoides no trato genital da fêmea, contém fatores que influenciam a motilidade (ACOTT; HOSKINS, 1978; BAAS et al., 1983), a fertilidade (KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1998) e a capacitação (MILLER, 1990).

Embora seja um fluido, no qual os espermatozoides são transferidos para o trato genital, o PS, particularmente o do touro, é nocivo para a sobrevivência da célula espermática (DOTT, 1974), ocasionando morte precoce dos espermatozoides, quando mantido em condições *in vitro* (SAHNI; MOHAN, 1998).

O PS do touro representa 50 a 90% do seu ejaculado, sendo formado por 10 a 40% de secreção da vesícula seminal, 4 a 6% da próstata e 5 a 10% do epidídimo, de acordo com Pernot e Szumowsky (1985). Seu conteúdo em proteínas, segundo os referidos autores, situa-se ao redor de 10% e influenciam na fertilidade, pois sua composição varia em animais férteis e inférteis.

Relatos em diferentes espécies sugerem que o PS contém fatores que podem influenciar a fertilidade, como observado em comparações da fertilidade de diferentes machos ou, através do isolamento de fatores que facilitam ou inibem a capacitação, fertilização e/ou eventos relacionados (MILLER et al., 1990).

A redução acentuada da fertilidade pode ser decorrente do reduzido número de espermatozóides, mas, também, devido ao decréscimo de componentes essenciais presentes no plasma seminal (GARNER et al., 1997).

Porém, tem sido referido, também, como prejudicial ao espermatozóide, no que diz respeito à sua estocagem (DOTT, 1974; PICKETT et al., 1975) e sua habilidade de fertilização (SHIVAJI; BHARGAVA, 1987), pois contém fatores não capacitantes e inibidores da motilidade (IWAMOTO; GAGNON, 1998) e componentes prejudiciais à viabilidade espermática (WAY et al., 2000), os quais podem influenciar negativamente no armazenamento do sêmen (MARTINUS et al., 1991). No entanto, a alta diluição do sêmen reduz o efeito deletério do PS sobre o sêmen refrigerado e estocado (JASCO et al., 1991).

Moore e Hibbit (1976) e Moustafa e Meszaros (1981) sugeriram que a ligação de proteínas do plasma seminal à membrana do espermatozóide provocaria alterações bioquímicas, as quais promoveriam injúria celular e choque térmico durante a congelação. A existência de fatores que afetam a fertilidade no líquido seminal bovino foi relatada por Katska et al. (1996); tais fatores seriam responsáveis pela estabilização das membranas plasmática e acrossomal, impedindo a reação acrossômica, bem como a capacitação espermática, em procedimentos de fertilização *in vitro*.

Segundo Garcia e Graham (1987) a presença de uma fração protéica de peso molecular entre 12 e 14 kDA é prejudicial para os espermatozóides, durante a congelação, pois é capaz de bloquear os efeitos benéficos de componentes da gema de ovo, competindo com os sítios de ligação da membrana plasmática; contudo, a remoção dessa fração protéica do PS, através de diálise, eliminou o efeito deletério, melhorando a congelabilidade do sêmen. Proteínas relacionadas com baixa (16 kDA, p_i de 6,7 e 16 kDA, com p_i de 4,1) e com alta fertilidade (26 kDA e 55kDA) foram descritas por Killian et al. (1993).

Henault e Killian (1996) verificaram que os espermatozóides, quando colocados em meio contendo PS de animais de alta fertilidade, têm maior habilidade para penetrar em oócitos, em ensaios *in vitro*, quando comparados aos meios contendo PS de animais de baixa fertilidade, sejam estes espermatozóides de animais de alta ou baixa fertilidade.

Barrios et al. (2000) submeteram amostras de espermatozóides ovinos, separados do PS por “dextran/swim-up”, ao choque térmico pelo frio. Posteriormente, incubaram estes espermatozóides com proteínas do PS e demonstraram a reversão dos danos causados pelo choque térmico à membrana, indicando que as proteínas presentes no PS são adsorvidas à membrana espermática e modificam as características funcionais de espermatozóides danificados, reproduzindo as características de uma célula intacta.

Ollero et al. (1997) afirmaram que, a remoção de moléculas de peso molecular menor do que 10 kDA, do PS, mantém a heterogeneidade da membrana plasmática, necessária à criopreservação. Sendo assim, a centrifugação do sêmen pode ser uma alternativa para reduzir ou eliminar frações protéicas indesejáveis; contudo, proteínas BSP A1/A2, principais proteínas ligadoras de heparina na espécie bovina, têm sido relacionadas com maior proteção à membrana espermática durante a congelção (MATTOS et al., 2004).

Estudos avaliando as características do PS e sua relação com a fertilidade são limitados. A presença, ausência ou uma crítica concentração de proteínas no PS pode potencialmente ser responsável pelos efeitos do PS sobre a fertilidade do sêmen (HENAULT; KILLIAN, 1996). Esses autores, investigando os efeitos do PS homólogo e heterólogo, sobre a habilidade fertilizante de espermatozóides de touro, observaram que espermatozóides de ejaculados de touros de baixa fertilidade foram discretamente melhorados pela adição de PS de touros de alta fertilidade, evidenciado através do teste de penetração de oócitos, livres de zona pelúcida (ZP). Entretanto, a penetração de espermatozóides de alta fertilidade foi deprimida quando os espermatozóides foram expostos ao PS de touros de baixa fertilidade.

Para a criopreservação do sêmen, a variação individual na composição do PS, entre diferentes garanhões, tem um papel significativo sobre a motilidade pós-descongelção (AURICH et al., 1996). Esses autores observaram que a adição de PS de garanhões rotulados como tendo sêmen de boa motilidade, pós-descongelção, ao sêmen de garanhões com baixa motilidade, incrementou a motilidade espermática, das amostras desses animais.

Efeito da adição de PS ao sêmen descongelado de carneiro, na tentativa de melhorar os resultados da inseminação intracervical, foi investigado com sucesso por Gil et al. (2002). Porém, o sêmen de carneiro contém relativamente pouco PS, tornando seu uso impraticável como aditivo, quando um grande número de ovelhas precisa ser inseminado (MATAVEIA et al., 2010).

Da mesma forma, o fluido prostático de cães, adicionados ao sêmen pós-descongelamento incrementa sua fertilidade, após inseminação vaginal (NÖTHLING et al., 2005). Gerber et al. (2003) relataram que a adição de PS bovino ao sêmen de búfalo africano, pós-descongelamento, incrementou sua habilidade de fertilizar oócitos bovinos *in vitro*, confirmando que o PS heterólogo pode ter um efeito sobre a fertilidade do espermatozoide.

2.2. Centrifugação do sêmen e remoção do plasma seminal

Uma alternativa para reduzir o PS do ejaculado é a centrifugação do sêmen. Em equinos, a remoção do PS é uma técnica utilizada rotineiramente na criopreservação de sêmen, sendo essencial e necessária para o sucesso da congelamento. A intensidade e tempo de centrifugação, adequada a uma maior recuperação de células espermáticas, com mínimos danos estruturais e funcionais aos espermatozoides, é um fator fundamental para a obtenção de bons índices de congelabilidade do sêmen (HEITLAND et al., 1996).

Segundo Sharma e Mahajan (1961), a adição de PS ao sêmen reduz o pH e aumenta o número de espermatozoides móveis. Contudo, em vista da grande variação observada na composição do PS, devido às mudanças na constituição química das secreções das glândulas sexuais anexas, os resultados têm sido, algumas vezes, inconsistentes (SAHNI, 1990), a ponto de Rodger (1975) declarar que o PS é um fluido desnecessário.

Nishikawa e Waide (1949) e Mcleod e MacGee (1950) foram os primeiros pesquisadores a fazerem uso da centrifugação para concentrar os espermatozoides, com relatos de efeitos benéficos e deletérios sobre a motilidade espermática, respectivamente.

Melhores resultados de motilidade espermática, após a descongelamento foram obtidos com sêmen de equinos centrifugados, em comparação com amostras não centrifugadas (BUEL, 1963; POLGE; MINOTAKIS, 1964). Rajamannan et al. (1968) demonstraram uma influência negativa do PS de equino, sobre a motilidade espermática, preconizando o uso da centrifugação para evitar efeito deletério do mesmo.

Entretanto, quase nenhum efeito sobre a motilidade espermática foi relatado por Pickett et al. (1975), após centrifugação de sêmen equino e bovino a 956 x g, com retirada de 80% do PS. Mencionaram, ainda, que a centrifugação acima de 1.000 x g diminui a capacidade fecundante do sêmen e que esta pode ser prejudicial à motilidade,

a não ser que baixa força centrífuga (370 a 829 g) seja empregada. Todavia, Len et al. (2008) postularam que a centrifugação ideal pode estar entre 900 e 4.500 g, a qual garantiria maior taxa de recuperação e menor dano ao espermatozóide, sem afetar a fertilidade.

A centrifugação do sêmen também foi utilizada por Martin et al. (1979) no procedimento para comparar os resultados de tempo médio de sobrevivência de espermatozoides acondicionados e congelados em macrotubo e “pellet”.

Papa et al. (1981), utilizaram forças de centrifugação de 1.000 e 2.000 g, por diferentes tempos, no processamento de sêmen de garanhões, com a finalidade de verificar a influência sobre a motilidade. Relataram, como melhor resultado, 2000 g, por cinco minutos, bem como efeito benéfico sobre a motilidade. Demonstraram, ainda, que a centrifugação é um método adequado para o nivelamento da variação de qualidade e volume de ejaculados equinos. As forças e tempos de centrifugação não apresentam efeito negativo sobre a motilidade e sobrevivência dos espermatozoides, avaliados através de coloração supravital. Observaram, também, um efeito positivo da centrifugação sobre a qualidade espermática, sendo que esta não depreciou a qualidade do sêmen, durante os testes de termo resistência a 5 °C e 37 °C.

Segundo esses autores, os ejaculados de equinos apresentam marcadas oscilações tanto no volume quanto na concentração e a centrifugação auxilia na padronização dos mesmos, sendo necessária e essencial para o sucesso da congelação.

Vidament et al. (2000) e Crocket et al. (2001) relataram uma maior motilidade pós-descongelação e fertilidade quando o sêmen de garanhões foi centrifugado a 22 e 25 °C, e resfriado a 5 °C, em comparação com o sêmen centrifugado a 5 °C.

Segundo Rigby et al. (2001) a fertilidade do sêmen centrifugado, com remoção do PS, e diluído em meio glicose-leite desnatado (GLD) suplementado com meio Tyrode modificado, foi similar à fertilidade do sêmen diluído em GLD, contendo 20% de PS. Tem sido preconizado que a presença de pequena quantidade de PS é necessária para melhorar a motilidade espermática pós-centrifugação e estocagem, sob refrigeração (PICKETT et al., 1975).

Altas diluições do sêmen equino reduzem os efeitos deletérios do PS no sêmen refrigerado (JASKO, 1991). A centrifugação e a remoção de todo o PS, resultou em insignificante redução da motilidade do sêmen, quando meios diluentes não complexos foram utilizados (JASKO, 1992), sugerindo que uma baixa concentração de PS ou um substituto do mesmo é essencial para o movimento espermático.

Da mesma forma, a variabilidade individual na composição do PS influenciou a motilidade dos espermatozóides, após o transporte sobre refrigeração (DAWSON et al., 2000).

Entretanto, o diluente suplementado com meio Tyrode pode ser superior para a manutenção das características de movimento de sêmen refrigerado, após a centrifugação, em comparação com a adição de 20% de PS ao meio GLD (RIGBY et al. 2001). Todavia, o sêmen diluído em meio Tyrode, modificado na presença de PS, tem motilidade reduzida, sugerindo uma aparente interação entre PS e a composição do meio diluente, de acordo com esses autores.

Assim, a sobrevivência das células espermáticas pode ser aumentada, particularmente, em ganhões identificados como tendo sêmen de baixa congelabilidade, através da remoção do PS, mediante centrifugação antes da re-suspensão dos espermatozóides no meio diluente (AURICH, 2008). Segundo Johannisson et al., (2009), a centrifugação do sêmen de ganhões, através de uma única camada de colóide, mostrou ser uma técnica útil para selecionar os melhores espermatozóides de um ejaculado e, desta forma, manter a qualidade espermática, durante a estocagem a 5 °C, por 48 horas.

A centrifugação do sêmen se torna essencial quando o meio diluente utilizado contém gema de ovo (BEDFORD et al., 1995; CORTELL, 1980); esses autores relataram efeitos depressivos sobre a motilidade, respectivamente em equinos e caprinos. Em carneiros, a remoção do plasma seminal também foi benéfica para a motilidade, linearidade e capacitação (GIL et al., 2000) e congelabilidade (OBA et al., 2004), bem como em caninos (ROTA et al., 1997).

Poucos são os relatos em relação à centrifugação do sêmen bovino antes da congelação. Rota et al. (1995) descreveram os efeitos prejudiciais do PS sobre a membrana plasmática dos espermatozóides. López e Encalada (1997) observaram que a remoção parcial do plasma seminal de amostras de touros com baixa concentração espermática (500×10^6) incrementou em mais de 40% a viabilidade de se congelar tais amostras com êxito.

Da mesma forma, Tanajura Neto et al. (2008), observaram que os parâmetros espermáticos, avaliados através de análise computadorizada, foram superiores para amostras de sêmen bovino centrifugado antes da congelação, em comparação com o grupo não centrifugado.

Em alguns protocolos de criopreservação de sêmen de cães (OLIVEIRA, 2006; MARTINS Jr. et al., 2008), a centrifugação tem sido utilizada como forma de concentrar a amostra ou eliminar a primeira e a terceira frações do sêmen de cães, respectivamente; no entanto, ela pode remover fatores inibidores da capacitação e prostaglandinas presentes no plasma seminal (OLIVEIRA, 2006).

Rijsselaere et al. (2002) demonstraram um efeito benéfico do sêmen canino centrifugado a 720 g, por 5 minutos, durante o armazenamento de sêmen refrigerado. Schäfer-Somi et al. (2006) observaram que, o efeito benéfico da centrifugação do sêmen canino, no caso incrementando a motilidade progressiva dos espermatozóides, dependeu do meio diluente utilizado.

Cunha e Lopes, (2009), avaliaram o efeito da centrifugação sobre a viabilidade do sêmen canino, observando que a mesma não causou danos aos espermatozóides, contudo, o meio de centrifugação influenciou na viabilidade espermática.

A interação entre o PS e o meio diluente pode ser fundamental para se obter amostras com maior viabilidade após a congelação, refletindo positivamente nos resultados de testes *in vitro* e *in vivo*.

Baseados nesses estudos, a centrifugação de sêmen tem-se tornado prática comum nos procedimentos de congelação, sendo empregada em diferentes protocolos e em diferentes espécies, sendo que a centrifugação e a eliminação do plasma seminal podem incrementar a viabilidade espermática pós-descongelação, refletindo beneficemente nos resultados de IATF e/ou de PIV.

2.3. Sêmen heterospermico

A baixa eficiência reprodutiva em bovinos é um dos principais problemas vivenciados pelos criadores. Uma vez que a fertilidade é obtida a partir de resultados de acasalamentos, uma parte da baixa eficiência reprodutiva em bovinos pode ser proveniente do touro (AZMAL et al., 2004). Assim, tentativas para maximizar a fertilidade do sêmen a ser utilizado na IA têm sido realizadas de diversas maneiras, num contínuo esforço para melhorar as taxas de concepção.

De modo usual, a fêmea é inseminada com o sêmen de um único macho, caracterizando uma inseminação homospermica. A utilização de sêmen homospermico exige milhares de inseminações para se comparar com precisão a fertilidade entre dois

machos. Por outro lado, o sêmen heterospérmico pode ser oriundo de múltiplas montas ou do uso da IA com o sêmen de vários machos (AZMAL et al., 2004).

Assim, a mistura de sêmen de diferentes machos tem sido rotulada como muito vantajosa em diferentes espécies (STEWART et al., 1974). Quando igual número de espermatozóides de dois indivíduos é misturado, antes da inseminação, diferenças no potencial de fertilização do espermatozóide são frequentemente observadas (BERGER, 1995). A oportunidade para reduzir os efeitos da variabilidade da fêmea é a principal vantagem do uso da inseminação com SH (BERGER; DALLY, 2001).

A inseminação heterospérmica é uma poderosa ferramenta para avaliar a fertilidade do macho (DZIUK, 1995), desta forma, machos que diferem pouco na fertilidade, quando inseminação homospérmica é utilizada, podem ser submetidos à inseminação com SH pode ser para sobressaltar essas diferenças (FLINT et al., 2003). Avaliação do potencial fertilizante do sêmen, através da inseminação com SH, é independente de diferenças na libido, desempenho durante a monta e do número de espermatozóides no ejaculado (BERGER, 1995).

Segundo Sacke (1983), se os espermatozóides de dois ejaculados, em uma inseminação heterospérmica são de igual habilidade fertilizante, cada macho será responsável por aproximadamente 50% dos descendentes. Beatty et al. (1976) demonstraram que a fertilidade individual do SH de touros foi afetada pelo processo de congelamento, mais não pelo período de estocagem.

O uso de SH proporciona uma técnica para avaliar a fertilidade do macho de uma forma exata e rápida, utilizando menos do que 40 fêmeas (FLINT et al., 2003). A inseminação com SH tem sido relatada ser muitas vezes mais eficiente na avaliação da fertilidade de touros, quando comparada com inseminação homospérmica (BEATTY et al., 1969).

Kushner (1954) relatou distintos méritos que podem ser obtidos a partir do uso SH, tais como: o aumento das taxas de concepção, melhor peso ao nascimento e rápido crescimento; contudo, Beatty (1956) e Frappell (1956) não conseguiram demonstrar as mesmas vantagens. Porém, Beatty (1969), mencionou que a utilização do SH pode aumentar a fertilidade, em comparação com o método convencional, ou seja, sêmen homospérmico.

Nenhum aumento significativo na taxa de prenhes foi obtido quando inseminações com mistura de sêmen de dois touros foram comparadas com inseminação

homospérmica, porém, inseminações heterospérmicas resultaram no desvio do número de descendentes esperados (NELSON et al., 1975).

Stewart et al. (1974) observaram diferenças no número de descendentes, quando espermatozóides de quatro touros foram misturados em igual número, sendo que um único touro produziu 50% da progênie. A combinação de ejaculados de diferentes reprodutores, em uma única dose, pode ser utilizada para melhorar a fertilidade de amostras de sêmen, potencializando os ganhos com fertilidade (NELSON et al., 1975).

Albrecht et al. (2005) testando duas diferentes concentrações de espermatozóides (12×10^6 e 28×10^6 , por palheta), em inseminações heterospérmicas (dois touros), em programa de IATF, observaram diferença significativa nas taxas de prenhes (61 vs. 69%, respectivamente).

Satake et al. (2006) relataram que, quando o sêmen de dois ou mais cachacos foram misturados, seguido de IA, os produtos nascidos formam direcionados a favor de um único macho, sem nenhuma explicação satisfatória para esse fato; entretanto, para alcançar o oócito, os espermatozóides precisam entrar no oviduto, onde estarão expostos a fatores que modulam sua atividade.

Collins et al. (2008), investigando a habilidade do espermatozóide suíno se ligar a zona pelúcida (ZP), observou que a inseminação heterospérmica foi efetiva em classificar a fertilidade do cachaco. Entretanto, a habilidade do espermatozóide se ligar a ZP não foi correlacionada significativamente com o número de leitões por leitegada.

Os testes de avaliação *in vitro* de espermatozóides, utilizados atualmente na indústria da IA, não são altamente correlacionadas com a fertilidade do macho, e, testar a fertilidade através da IA tradicional, é um procedimento de custo elevado e que consome muito tempo. A utilização de SH, com a associação da genotipagem de embriões é mais rápida e um método preciso para avaliar a capacidade fertilizante relativa de espermatozóides, dentro de um grupo de touros (FLINT et al., 2003).

O aumento na fertilidade tem sido relatado em bovinos quando inseminações com sêmen heterospérmico foram comparadas com sêmen homospérmico (AZMAL et al., 2004).

Experimentos com a utilização de plasma heterólogo são escassos, motivo pelo qual quase nada tem sido relatado. Contudo, a habilidade do PS influenciar a fertilidade de sêmen bovino foi testada por Henault e Killian (1996), através da penetração de espermatozóides na ZP de oócitos bovinos. A penetração de espermatozóides de touros

de baixa fertilidade, com PS de touros de alta fertilidade, foi maior em relação aos ejaculados de touros de alta fertilidade com PS de baixa fertilidade.

A adição de PS de garanhões com sêmen de alta motilidade, pós-descongelção, ao sêmen de garanhões portadores de baixa motilidade espermática foi benéfica, melhorando a motilidade deste grupo de animais (AURICH et al., 1996).

O sêmen heterospérmico pode ser um grande trunfo para os pecuaristas que visam o melhoramento genético do rebanho. Em rebanhos comerciais de corte e leite os acasalamentos são baseados nas características de produção e o melhoramento genético se faz com populações e não com indivíduos.

A utilização de SH pode ser aplicada de várias formas e em diferentes áreas de investigação reprodutiva, bem como para determinar a fertilidade de machos, cujo sêmen tenha sido processado através de diversas técnicas.

2.4. Avaliação espermática

Os primeiros relatos científicos da manipulação seminal foram publicados por Leewenhoek, na Inglaterra, em 1678, quando visualizaram, pela primeira vez, as células espermáticas ao microscópio, classificando-os como animais microscópicos ou, como citado, animálculos (FOOTE, et al., 2002). Desde então, desenvolveram-se os métodos de avaliação do sêmen. Anderson (1942) descreveu como o melhor e o mais utilizado, desde aquela época, a análise microscópica da proporção de espermatozóides com movimentos progressivos normais, parâmetro utilizado até hoje.

Por diversas décadas, pesquisadores têm dedicado esforços ao desenvolvimento de técnicas laboratoriais que possam acuradamente prever o potencial de fertilidade de um macho; atualmente, encontrar um método mais eficiente para estimar a fertilidade é um objetivo a ser alcançado (STRADAIOLI et al., 2009). Entretanto, este problema tem sido desafiador, uma vez que a maioria dos testes somente avaliam um único atributo espermático, o qual improvavelmente prediz com acurácia a fertilidade, pois o espermatozóide tipicamente necessita de diversos requerimentos para completar a fertilização com sucesso.

A avaliação do potencial de fertilidade do sêmen é muito importante antes de sua utilização em programas de IA ou PIV, como forma de obter bons resultados (GÁRCIA-ÁLVAREZ, et al., 2009). Muitas pesquisas têm sido direcionadas ao estudo

da relação entre os parâmetros espermáticos e a fertilidade *in vivo*, com resultados controversos (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ; BARTH, 2007).

Diversos métodos para a análise do sêmen *in vitro* avaliam características gerais do espermatozóide (motilidade, integridade de membrana plasmática, integridade de organelas, integridade do DNA, entre outras), todas consideradas essenciais para a fertilidade (MARTÍNEZ-PASTOR, et al., 2008). Contudo, a relação entre a qualidade espermática, avaliando-se todas as diferentes características espermáticas e a fertilidade, varia consideravelmente entre os pesquisadores (O'MEARA et al., 2008), sendo necessário encontrar métodos mais acurados para avaliar a fertilidade de amostras seminais.

A classificação do espermatozóide como célula viável tem sido frequentemente relacionada com sua motilidade (LIU; FOOTE, 1998). A motilidade é um dos parâmetros mais importantes utilizados na avaliação da qualidade do sêmen. Além disso, a avaliação da motilidade espermática fornece informações importantes sobre a reserva energética dos espermatozoides de mamíferos (MUINO et al., 2008). Contudo, segundo Stradaoli et al. (2009), o exame morfológico e de motilidade espermática são insuficientes para prever o sucesso reprodutivo do macho. Desta forma, o exame de múltiplos atributos é necessário como o objetivo final de predição da fertilidade.

A estimativa visual da motilidade espermática é o método mais simples, rápido e barato, porém, é subjetiva (ANZAR et al., 1991), sendo um dos parâmetros mais utilizados para determinar a qualidade do sêmen bovino, embora tenha sido reportada como sendo forte ou pobremente correlacionada com a fertilidade (JANUSKAUSKAS et al., 2000). Variações de 30 a 60%, quando um mesmo ejaculado é avaliado por diferentes técnicos, foram descritas por Coetzee et al. (1999) e Verstegen et al. (2002).

Saliente-se que, a motilidade espermática é reduzida e a membrana plasmática danificada durante o processo de criopreservação (WATERHOUSE et al., 2010). Posteriormente, foram desenvolvidas novas técnicas de avaliação espermática em microscópios de campo de luz e de contraste de fase, citometria de fluxo e análise computadorizada do movimento espermático ("computer- assisted sperm analysis"; CASA), os quais contribuíram muito para o avanço da análise das amostras seminais (FOOTE, 1998).

Viana (2004) relatou que os resultados de motilidade obtidas através, da análise subjetiva, é em média 6% menor do que aqueles obtidos, através da análise computadorizada do movimento espermático.

A utilização de fluorocromos tem proporcionado a avaliação da função mitocondrial e da integridade da membrana plasmática (MARTINEZ, 2000). As sondas fluorescentes são muito utilizadas, pois possuem a capacidade de se difundir pelas células integras ou lesionadas, atuando através de reações com enzimas citoplasmáticas ou de ligação com o DNA espermático (ARRUDA et al., 2003).

O desenvolvimento de técnicas que permitam prever com acurácia o potencial fertilizante do sêmen é essencial e tem sido alvo de inúmeras investigações, pois vários fatores inerentes aos espermatozóides são necessários para sua funcionalidade normal (GRAHAN et al., 1990; ARRUDA, 2000). Assim, somente a associação de vários parâmetros pode conferir maior confiabilidade nos resultados da avaliação da fertilidade de uma amostra seminal (Den DASS, 1997), não existindo um teste que, isoladamente, permita estimar o potencial fecundante do sêmen (BÓ et al., 2005).

Entretanto, admite-se que somente 50 a 60% da variação na fertilidade entre machos, observada através da análise das características seminais, pode prever a fertilidade do sêmen (SAACKE, 2008) e, sendo assim, a natureza da sub-fertilidade do macho é tão complexa quanto aquela da fêmea.

Existe uma grande variação na correlação entre testes laboratoriais e fertilidade, em nível de campo (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003). Desta forma, prever a fertilidade é mais incerto do que estimar a fertilidade (FOOTE, 2003). Furstoss et al. (2010) relataram que, muitos pesquisadores objetivando identificar as variáveis que eram significativamente relacionadas com fertilidade, em nível de campo, nunca testaram modelos matemáticos para as mesmas, com a finalidade de verificar sua validade. A principal razão para isto é que a avaliação da fertilidade *in vivo* é onerosa e demanda muito tempo.

2.4.1. Análise computadorizada da cinética espermática (CASA)

Nas avaliações de qualidade seminal, a motilidade é a característica de viabilidade mais investigada e uma das mais importantes associadas ao potencial de fertilização, reportando-se uma clara associação entre a ausência do movimento e os quadros de infertilidade (OLDSCLARKE, 1996).

A análise da trajetória do sêmen, baseada na avaliação individual do espermatozóide, fornece um cálculo médio acurado de diferentes parâmetros

espermáticos (VERSTEGEN et al., 2002). Este método foi primeiramente desenvolvido usando fotomicrografias com múltiplos tempos de exposição, com a finalidade de seguir o movimento do espermatozóide (DAVID et al., 1981). A técnica CASA foi proposta pela primeira vez por Dott e Foster (1979), sendo agora utilizada em diversos centros de andrologia humana e veterinária.

A principal vantagem da análise computadorizada, em relação à avaliação convencional do movimento espermático, em microscopia de luz, está relacionada com a maior repetibilidade e objetividade, fornecendo informações de parâmetros cinéticos de uma amostra de sêmen, com base na avaliação individual das células (JANUSKAUSAKA; ZILINSKAS, 2002), avaliando-se as variáveis detalhadamente, o que não é possível através da análise convencional subjetiva (MOSES et al., 1995).

A técnica da CASA utiliza um software que analisa e salva as informações relativas a várias características do movimento espermático (CONTRI et al., 2010), tais como: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), linearidade (LIN, %), progressividade (STR, %) e rapidez (RAP, %). A avaliação das características seminais através da técnica CASA melhora a objetividade e precisão da análise (KRAUSE, 1995). Entretanto, existem poucos relatos sobre a metodologia em animais domésticos, especialmente na espécie bovina (CONTI et al., 2010).

Um grande número de dados suporta a hipótese de que ejaculados de mamíferos constituem uma população heterogênea de espermatozóides, dentro da qual diferentes subpopulações coexistem (ABAIGAR et al., 1999). Tal heterogeneidade torna possível ao trato genital feminino exercer múltiplos processos seletivos, os quais reduzem a população de milhões para poucos espermatozóides competentes (HOLT; Van LOOK, 2004). Essas diferentes subpopulações têm sido estudadas principalmente no sêmen de equino (QUINTERO-MORENO et al., 2003), suíno (ABAIGAR et al., 1999) e canino (NUÑEZ-MARTÍNEZ et al., 2006), nos quais é possível identificar e quantificar subpopulações de espermatozóides com específicos padrões de movimento.

Utilizando a técnica de análise computadorizada do sêmen, Hoflack et al., (2007) demonstraram que a motilidade espermática diferiu entre touros das raças Azul Belga e Holandês, observando uma maior proporção de espermatozóides vivos em ejaculados de touros da raça Holandês, com uma mais alta porcentagem de espermatozóides exibindo

motilidade total e progressiva. Relataram, ainda, uma baixa eficiência de movimento espermático em touros da raça Azul Belga, evidenciada por um reduzido valor de BCF combinado com um elevado valor de ALH. Finalmente, declararam que estas diferenças parecem estar relacionadas com a morfologia espermática, sugerindo, também, que um componente genético poderia ser responsável pelas diferenças no movimento espermático entre as duas raças.

Muiño et al. (2008) relataram a existência de quatro subpopulações no sêmen fresco e congelado, para os oito parâmetros cinéticos estudados, em bovinos da raça Holandês. Afirmaram, ainda, que o processo de criopreservação significativamente modificou a distribuição dos espermatozóides dentro das subpopulações, sendo que estas alterações foram consistentes entre touros e ejaculados.

Milligan et al. (1980) observaram que espermatozóides de homens férteis e inférteis poderiam ser distinguidos com base nas medidas de velocidade espermática. Em alguns estudos, medidas de velocidade do espermatozóide têm sido correlacionadas com penetração em oócitos desprovidos de ZP, tanto em humanos quanto em hamster (FETTERHOLF; ROGERS, 1990).

Em touros, a grande fonte de variação torna comparações difíceis (VERSTEGEN et al., 2002), pois diferem grandemente em todas as variáveis relacionadas com a motilidade e velocidade. Entretanto, ainda que exista uma ampla variação inter-animais, porcentagens combinadas da motilidade e velocidade têm sido altamente correlacionadas com a fertilidade (0,87), quando esta foi definida aos 59 dias do não retorno ao cio (FARRELL et al., 1998). Esses autores relataram, ainda, que, quando diversas variáveis foram coletivamente correlacionadas com fertilidade, altos valores de R^2 foram obtidos, sugerindo que a fertilidade potencial do touro pode ser estimada a partir da qualidade do movimento espermático.

Os valores de VAP, VCL e VSL foram significativamente maiores em amostras que produziram mais que 50% de oócitos fertilizados do que naquelas com menos de 50% de fertilização (VERSTEGEN et al., 2002). Uma correlação positiva entre o número total de espermatozóides móveis inseminados, VCL e fecundação foi observada por Byrd et al. (1990), sendo que o VCL sozinho, também, pode prever a fertilidade (MARSHDURN et al., 1992). Da mesma forma, Verstegen et al. (2002) observaram que os valores do VCL, VSL e do número total de espermatozóides foram positivamente correlacionados com a taxa de concepção.

O ALH é uma importante característica do espermatozóide, uma vez que afeta os resultados de FIV (JEULIN et al., 1996) e a habilidade de espermatozóides humanos penetrarem no muco cervical e fusionar com o oócito (AITKEN; FISCHER, 1994). Este parâmetro é de importância, pois indica o vigor do batimento flagelar, juntamente com a frequência de rotação da célula (DAVID et al., 1981), os quais são provavelmente importantes para a progressão do espermatozóide dentro do muco cervical e envelope peri oócito.

Jeulin et al. (1996) demonstraram que, o ALH de espermatozóides selecionados, através da técnica de “swim-up”, estava correlacionado positivamente com as taxas de fertilização, resultado confirmado por Sukcharoen et al. (1995). Chan et al. (1990) relataram que o VCL de espermatozóides separados, por “swim-up”, foi o mais significativo fator relacionado com a FIV.

Segundo Donnelly et al. (2000), o BCF não teve nenhum efeito sobre a FIV ou taxa de prenhes, embora Suarez et al. (1991) tenham observado correlação positiva para essas características. Da mesma forma, a progressividade e linearidade também foram correlacionadas positivamente, em trabalho desenvolvido por Sukcharoen et al. (1995).

De acordo com Verstegen et al. (2002), a importância do VCL e VAP, na predição da fertilização, pode mostrar a importância da capacitação no processo de fecundação, pois estas características são incrementadas após esse processo. Uma vez que a capacitação é seguida pelo desenvolvimento da hiperativação, a identificação de espermatozóides hiperativados, também, é importante.

Entretanto, ainda não estão bem definidas quais características da cinética espermática, obtidas através da técnica CASA, são capazes de estimar a fertilidade (FERREIRA et al., 1997). Assim, mesmo com tal equipamento, a análise do movimento espermático apresenta inconsistente correlação com os índices de concepção, quando utilizada isoladamente, visto que a motilidade espermática é apenas um dos pré-requisitos básicos indispensáveis para que o espermatozóide se torne apto à fertilização (MAZIERO et al., 2008).

Segundo Tardif et al. (1997) os parâmetros de velocidade podem ser mais úteis do que a porcentagem de espermatozóides móveis na predição da fertilidade do sêmen de touro. Porém, a linearidade do movimento espermático tem sido relacionada significativamente com a fertilidade em nível de campo (FARREL et al., 1998).

Como rotina, a técnica CASA tem sido empregada em vários estudos, entre eles, aqueles relacionados com diferentes meios de congelamento de sêmen (MOUSSA et al.,

2001; AIRES et al., 2003; AMIRAT et al., 2004), assim como, de crioprotetores (AWAD, 2011).

2.4.2. Análise da integridade da membrana plasmática (IMP)

A membrana plasmática envolve inteiramente a célula espermática, sustentando suas organelas e os componentes intracelulares, mantendo o gradiente químico de íons e outros componentes solúveis, devido à sua característica semipermeável (SILVA; GADELLA, 2006).

Todas as etapas dos procedimentos utilizados para a criopreservação do sêmen causam danos à membrana plasmática, núcleo e organelas do espermatozóide (SILVA; GADELLA, 2006), observando-se queda significativa da viabilidade espermática (HAMMERSTED et al., 1990).

A integridade da membrana plasmática exerce um papel importante na sobrevivência do espermatozóide no trato genital feminino, bem como na manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS; GRAHAM, 1992), além de ser essencial ao metabolismo, ligação ao oócito e reação acrossômica, sendo útil para a predição da habilidade fertilizante do espermatozóide (BRITO et al., 2003).

A estabilidade e integridade da membrana, assim como sua característica semipermeável, são pré-requisitos para a viabilidade do espermatozóide. Além disso, se a plasmalema está intacta, mas funcionalmente instável, o espermatozóide não é capaz de interagir com seu ambiente e, desta forma, é incapaz de fertilizar (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2007).

Os danos causados nas membranas espermáticas promovem a perda de componentes celulares, diminuindo a viabilidade e motilidade pós-descongelção (SEVERO, 2009). As modificações observadas nas membranas são semelhantes aquelas que ocorrem nas células capacitadas, sendo relatado que a congelação do sêmen promove a sua capacitação (BAILEY et al., 2000).

A fertilidade reduzida tem sido atribuída ao processo de congelação do sêmen, o qual produz danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais nas membranas espermáticas (WATSON, 1995). A importância de se avaliar a integridade estrutural da célula espermática deve-se ao fato de a IMP ser importante para que ocorram os eventos fisiológicos relacionados ao processo de fertilização, os quais incluem a capacitação

espermática, a ligação à ZP, a reação acrossomal e a fusão dos gametas (PAPA et al., 2000).

A IMP tem sido um dos mais estudados parâmetros espermáticos, pois atua interagindo com as células do oviduto e oócito, tanto morfológica quanto fisiologicamente (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 1997). Alguns testes têm sido desenvolvidos para avaliar a IMP, entre eles, os testes da coloração supravital e o hiposmótico. O primeiro fornece informações sobre a integridade da membrana da cabeça do espermatozóide, enquanto que o outro avalia a integridade da cauda do espermatozóide (TARTAGLIONE; RITTA, 2004). A IMP tem sido correlacionada com a fertilidade (GIL et al., 2000; JANUSKAUSKAS et al., 2000).

Mais recentemente, sondas fluorescentes têm sido utilizadas para verificar a integridade estrutural das membranas espermáticas, assim como, a conjugação destas, para avaliar os vários compartimentos celulares ao mesmo tempo (CELEGHINI et al., 2007). Tem sido uma das técnicas mais utilizadas no processo de avaliação das injúrias sofridas pela célula durante o processo de criopreservação (DELL'AQUA, 2002).

Associações de sondas fluorescentes permitem avaliar mais do que um compartimento da célula espermática (CELEGHINI, 2005) e destacam-se como as mais utilizadas na determinação da integridade das membranas dos espermatozoides, gerando dados quantitativos sobre a permeabilidade relativa das mesmas e especificidade na diferenciação entre células funcionais e afuncionais (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2003).

Atualmente, a IMP do espermatozóide tem sido avaliada através do emprego das sondas fluorescentes de iodeto de propídeo e SYBR-14, proporcionando uma informação simultânea da proporção de células espermáticas vivas e mortas (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2007). A manutenção da IMP parece estar mais intimamente relacionada com a fertilidade do sêmen do que com a motilidade, mas somente quando um grande número de espermatozoides é contado (PEÑA et al., 2006).

Na prática, têm sido empregadas, principalmente, em estudos relacionados com diferentes meios de congelamento de sêmen de touro (MOUSSA et al., 2001; AIRES et al., 2003; AMIRAT et al., 2004), ou em experimentos diversos (OLIVEIRA et al., 2010).

2.5. Avaliação do padrão eletroforético de proteínas do PS.

A avaliação de parâmetros bioquímicos do sêmen é importante para estimar sua capacidade de preservação e poder fertilizante (SINGH et al., 1989). Parte da variação na fertilidade, observada entre touros, é devido aos fatores não aparentes em avaliações laboratoriais de rotina (KILLIAN, 1992). A possibilidade de se identificar amostras de sêmen de baixa fertilidade, antes da IA, é vital para maximizar a eficiência reprodutiva (BRAUNDMEIER et al., 2002).

Durante a ejaculação, quando os espermatozóides são misturados com as secreções das glândulas sexuais anexas, sua motilidade é estimulada e algumas proteínas e lipídeos do PS aderem à membrana plasmática, podendo afetar a fertilidade do sêmen (KILLIAN, 1992).

A eletroforese é uma técnica baseada na separação de partículas, que ocorre quando as mesmas são dissolvidas ou suspensas em um eletrólito, através do qual uma corrente elétrica é aplicada. É também utilizada na identificação de substâncias, no estudo de homogeneidade de sistemas biológicos e na determinação de pontos isoelétricos.

Esta técnica consiste na migração de moléculas ionizadas, em solução, de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares, em um campo elétrico. Moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo (ânodo) e moléculas com carga positiva migram para o pólo negativo (cátodo). Nas décadas de 1950 a 1960, a técnica de eletroforese começou a ser utilizada para mapear e identificar componentes protéicos solúveis de ejaculados (JOBIM et al., 2003).

O padrão eletroforético das proteínas do PS tem sido investigado com o objetivo de se caracterizar possíveis marcadores bioquímicos (MARTINS JÚNIOR, 1993; KILLIAN et al., 1993). Através de eletroforese unidimensional, o perfil protéico do plasma seminal bovino foi correlacionado com padrões de fertilidade normal e alterado (ROCHA et al., 1984) e, ainda, com a viabilidade do sêmen (AURICH, 1996).

Inicialmente foi utilizada a eletroforese em acetato de celulose, a qual foi substituída pelos géis de amido, mas, os melhores resultados têm sido obtidos com géis de poliacrilamida.

Estudos preliminares sobre a separação eletroforética de proteínas do PS, através de gel de amido, demonstraram que a concentração dessas proteínas não era suficiente para permitir sua detecção (VESSELINOVITCH, 1959).

Os primeiros estudos sobre a eletroforese do PS bovino foram conduzidos por Larson e Salisbury, (1954), os quais demonstraram a presença de onze componentes, sendo que três destes compunham a maioria das proteínas presentes. Rattan et al. (1972) relataram a existência de heterogeneidade das proteínas do PS entre raças (Jersey, Holandês e “Red Sindhi”) e espécies (Murrah), após eletroforese em papel, do sêmen e do PS.

Bhatt et al. (1979) comparando o padrão eletroforético de proteínas do PS, em gel de amido, de touros das raças Holandês, Jersey, Rathy e Nagauri, observaram pequenas diferenças no número de bandas (7 a 8), contudo, variações significativas ocorreram em relação ao número de frações mais evidentes.

A eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida é uma técnica valiosa para a separação e caracterização das proteínas, sendo que através deste método, muitas proteínas do plasma seminal, de várias espécies, foram descritas (JOBIM et al., 2004; KILLIAN et al., 1993; MANJUNATH et al., 2002; RONCOLLETTA et al., 1999).

Estudos de Manjunath et al. (2002) indicaram que as principais frações protéicas (50-70% ou 30-50 mg/mL) do plasma seminal bovino eram representadas por uma família de proteínas relacionadas, designadas como BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 a BSP-30 kDa, coletivamente chamadas de proteínas do PS. As proteínas BSP-A1 e BSP-A2 são conhecidas como PDC-109 (TANYA et al., 2003), sendo uma das três principais proteínas ligadoras de heparina do PS bovino e a mais abundante das BSPs (15 a 20 mg/mL).

Castro et al., (1986), investigando o padrão eletroforético (gel de poliacrilamida a 7,5%) e a proteína total (PT) do PS, de touros da raça Mantiqueira, demonstraram a presença de oito a onze frações protéicas.

Em experimento conduzido por Martins Júnior (1993), foram analisados os perfis eletroforéticos das proteínas do PS de touros de origem européia e zebuína. Observaram 5 padrões diferentes de migração, com a presença de 7 a 9 bandas, em mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida a 7,5%.

Roncolletta et al., (1999), estudando o perfil das proteínas do PS, através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 13%, em touros da raça Gir, identificaram elevada concentração de uma proteína (61.800 kDa) no sêmen de alta congelabilidade, sugerindo um possível marcador bioquímico predizendo o potencial de criopreservação do sêmen bovino.

Bianchi et al., (2008) observaram a presença de nove bandas polipeptídicas com pesos moleculares que variaram de 11,97 a 122,52 kDa, no PS de suínos, através de SDS-PAGE. Concluíram que, o polipeptídeo de 26,58 kDa estava associado à baixa IMP do espermatozóide suíno, pós-descongelamento.

Ao contrário do plasma sanguíneo bovino, o conteúdo protéico do PS apresenta considerável variação: 5,17 a 6,08 g% (SINGH et al., 1989), 3 a 8 g% (CASTRO et al., 1986), 8,0 a 24,36 g/dL (MARTINS JÚNIOR, 1993), consistindo, principalmente, de globulinas (RATTAN et al., 1972; BHATT et al., 1979).

2.6. Dosagem de testosterona

A testosterona é um hormônio esteróide, produzido nas células de Leydig, sintetizada em pequenas concentrações no córtex das glândulas adrenais (GUYTON, 1992), sendo essencial para a função reprodutiva dos machos, pois atua estimulando os estádios finais da espermatogênese e prolongando a vida útil dos espermatozóides no epidídimo, bem como estimulando o crescimento e o desenvolvimento dos ductos deferentes, da genitália externa e das glândulas sexuais anexas, além da atividade secretora destas.

A manutenção das características sexuais secundárias, comportamento sexual ou da libido do macho, também, são controladas pelos andrógenos (HAFEZ, 1995). Estudos realizados por O'DONNELL et al. (1994), em ratos, demonstraram que o desenvolvimento das espermátides arredondadas para a forma alongada é altamente dependente de testosterona.

A deficiência de energia é provavelmente o fator nutricional que mais influencia na fertilidade, retardando o início da produção espermática e a maturidade sexual (FLIPSE; ALMQUIST, 1961; NOLAN et al., 1990), bem como reduzindo a concentração de testosterona circulante (CHASE et al., 1993). MARTIN et al. (1994) observaram, em carneiros púberes, maiores concentrações de testosterona com dietas contendo alta energia, em relação aos de baixa energia.

Vários pesquisadores têm demonstrado que a concentração de testosterona apresenta picos durante as 24 horas do dia, os quais, geralmente, estão associados aos picos de LH. Katalonge et al. (1971), estudando as relações entre LH e testosterona, em touros *Bos taurus taurus*, observaram padrão cíclico de liberação de LH, com 5 a 10

picos durante as 24 horas, no qual cada pico de LH estava associado a um de testosterona. Constataram, também, que as concentrações de testosterona plasmática variaram de 2 a 20 ng/mL. Sanwal et al. (1974) e Barbosa (1987) verificaram que touros apresentaram, em média, três picos de testosterona.

Correlações significativas têm sido demonstradas entre a concentração sanguínea de testosterona com a fertilidade e a motilidade espermática. Post e Chtistensen (1976), trabalhando com touros mestiços, verificaram maiores concentrações de testosterona naqueles animais com maiores taxas de fertilidade, avaliadas pelo número de vacas gestantes.

Andersson (1992) relatou correlação positiva entre a concentração de testosterona sérica e a fertilidade de touros, avaliada através da taxa de não retorno ao cio. Constatou, também, que os animais com maior motilidade espermática apresentaram, em média, maior concentração de testosterona.

Barbosa (1987), trabalhando com touros das raças Canchim e Nelore, obteve correlações entre a concentração plasmática de testosterona com o ejaculado (volume x concentração) e a circunferência escrotal, em touros da raça Canchim, aos 39 meses de idade, além da capacidade de serviço, em touros da raça Nelore, aos 27 meses de idade. As concentrações de testosterona foram maiores nos touros Nelore (3,1 e 4,1 ng/mL) em relação aos touros Canchim (1,2 e 2,1 ng/mL), aos 27 e 39 meses de idade, respectivamente.

2.7. Produção de embriões *in vitro* (PIV)

O primeiro bezerro nascido de FIV, a partir de um oócito maturado *in vitro*, ocorreu em 1981 (BRACKETT et al., 1982).

O aprimoramento dos sistemas envolvidos no processo de PIV de embriões, na espécie bovina, a partir de oócitos recuperados de folículos de ovários de vacas abatidas, tem sido fundamental para o estudo e compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante este período, desde a maturação dos oócitos, o processo de capacitação espermática e fertilização, o início do desenvolvimento embrionário até a fase de pré-implantação (HOSHI, 2003), bem como estimar a fertilidade de amostras de sêmen *in vitro*.

No entanto o melhor método para se verificar a fertilidade de um touro é a observação da taxa de concepção após IA ou monta natural (ZANG et al., 1999), dado

que a habilidade de o espermatozóide, criopreservado, fertilizar é um fator importante para se obter altas taxas de prenhes (De LEEUW et al., 1993). Entretanto, testes de campo apresentam custos elevados e demandam tempo para a obtenção de resultados (LARSSON; MARTÍNEZ-RODRIGUÉZ, 2000).

Por outro lado, a avaliação rotineira da qualidade do sêmen congelado/descongelado, através de análise da concentração, morfologia e motilidade, são de valor limitado para estimar a fertilidade, em nível de campo (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2006), além disso, nenhuma correlação tem sido observada entre a motilidade e a fertilidade do sêmen de mamíferos (STALHAMMAR et al., 1994). Sendo assim, a predição da fertilidade *in vitro* e *in vivo*, a partir da motilidade espermática, é inapropriada em muitas espécies (AMANN, 1989; ROTH et al., 1998; COMIZZOLI et al., 2001).

Desta forma, diferentes testes funcionais *in vitro*, visando avaliar diretamente a capacidade fertilizante do espermatozóide, têm sido desenvolvidos, entre eles o da penetração em muco cervical (SHARARA et al., 1995; O'HARA et al., 2010), o da habilidade de se ligar à ZP (ZHANG et al., 1995; COLLINS et al., 2008) e da penetração em oócitos homólogos (AIRES et al., 2003) ou heterólogos (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2009).

No entanto, de acordo com Amann e Hammerstedt (2002), a taxa de clivagem, após a fertilização *in vitro*, é o melhor teste disponível para expressar a fertilidade, pois requer espermatozoides móveis, com morfologia normal e capacidade para ativar o oócito (BRAUNDMEIER et al., 2002). Esse procedimento proporciona a avaliação das interações entre oócito e espermatozóide, que ocorrem durante a fertilização, permitindo, ainda, o monitoramento das fases iniciais do desenvolvimento embrionário (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2009).

Há de se considerar, porém, que os resultados da relação entre as taxas de fertilização *in vitro* e fertilidade têm sido variáveis, provavelmente, em decorrência da variabilidade entre lotes de oócitos, manuseio do sêmen e manipulação laboratorial (BRAUNDMEIER et al., 2002).

Diversos pesquisadores (MARQUANT-Le GUINE et al., 1990; HILLERY et al., 1990; SHAMSUDDIN; LARSSON, 1993; LONERGAN, 1994; ZHANG et al., 1997; WARD et al., 2001; WARD et al., 2003) relataram que tanto a taxa de clivagem como a de formação de blastocistos pode ser utilizada como ferramenta para predizer a fertilidade de um touro, em nível de campo, ou distinguir entre touros de diferentes

fertilidades; porém, segundo Kurtu et al. (1996) e Kreysing et al. (1997), mencionaram que somente a taxa de clivagem estava correlacionada com fertilidade de touros *in vivo*, uma vez que a produção de blastocistos está mais relacionada com as condições de cultura dos embriões.

Contudo, outros autores não observaram relação entre FIV e fertilidade, em nível de campo, concluindo que este procedimento não é ideal para se avaliar a fertilidade *in vivo* (OHGODA et al., 1988; SCHNEIDER et al., 1999; DHALI et al., 2009).

Desta forma, as técnicas citadas têm sido largamente utilizadas na avaliação de diferentes atributos dos espermatozóides, independentemente de ser uma análise morfológica ou funcional, com finalidade de dar mais confiabilidade aos resultados e, assim, poder predizer possível associação com fertilidade *in vitro* e/ou *in vivo*.

Assim, Aires et al. (2003) e Amirat et al. (2004) fizeram uso das técnicas de penetração espermática de oócito e de produção de blastocistos, respectivamente, para avaliar diferentes meios de congelamento de sêmen.

Com o objetivo de comparar três métodos para avaliar a membrana plasmática de espermatozóides bovinos (teste hiposmótico, eosina-nigrosina e “tripan-blue”), Brito et al. (2003) demonstraram que, apenas o teste hiposmótico contribuiu para predizer a qualidade espermática, com base na verificação da taxa de fertilização *in vitro*, sendo esta, definida pela porcentagem de oócitos clivados entre 48 e 72 horas, pós-incubação dos gametas.

A partir de pesquisa realizada por Ward et al. (2003), visando verificar os efeitos da redução da concentração espermática, durante a FIV, sobre a habilidade de se diferenciar touros de alta e baixa fertilidade *in vivo*, foi constatado que touros com as mais altas taxas de fertilidade, em nível de campo e elevadas taxas de FIV, tiveram um acentuado declínio na taxa de fertilização *in vitro*, à medida que a concentração dos espermatozóides decresceu, diminuindo, assim, a possibilidade de se distinguir touros de alta ou baixa fertilidade *in vitro*.

Tartaglione e Ritta (2004) demonstraram a relação entre dois testes de avaliação espermática (hiposmótico e “tripan blue-giemsa”) e a taxa de fertilização *in vitro*, observada pela presença dos pró-núcleos, em oócitos fixados.

Mais recentemente, Carvalho et al. (2010) utilizaram as taxas de fertilização, bem como a de PIV, para comparar o sêmen congelado sexado com o sêmen não sexado. Observaram que, o procedimento de sexagem, através de citometria de fluxo, afetou

algumas características estruturais do espermatozóide, mas não a taxa de fertilização e de formação de blastocistos, as quais foram similares entre os dois grupos.

Naib et al. (2011) empregaram as técnicas de penetração em muco e de PIV embriões para avaliar o sêmen de touros classificados como tendo alta (AF) ou baixa fertilidade (BF), em nível de campo. Concluíram que, os espermatozóides de touros AF foram mais efetivos em penetrar o muco artificial e fertilizar os oócitos, embora a taxa de produção de embriões tenha se mantido similar entre os dois grupos de touros.

Estimativa da fertilidade de touros, mediante análise de resultados de PIV e de IATF, foi relatada por Sudano et al. (2011), os quais avaliaram os dados através do modelo de inferência estatística de Bayesian.

TRABALHOS CIENTÍFICOS

CALEGARI, R.S. “Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*”

***Trabalho científico número 1 a ser enviado à revista Theriogenology
(Apêndice.1)***

Influência do sêmen heterospermico e homospermico congelado, a partir de amostras com alta e média congelabilidade, sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*

R.S. Calegari^a, A. Martins Jr.^{b*}, D.G. Souza^a, A.M. Crespilho^a, C.S. Frade^b, A.A. Ramos^c, E.Oba^a

^a Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

^b Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil.

^c Departamento de Produção Animal – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

*Autor para correspondência.

Prof. Dr. Alicio Martins Júnior

Endereço: Rua Clóvis Pestana, 793, CEP: 16050-680, Araçatuba/SP, Brasil.
Universidade Estadual Paulista, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, UNESP, Câmpus de Araçatuba.

Tel: + 55(18) 3636-1410

e-mail: amartins@fmva.unesp.br

Resumo

Este estudo foi realizado com o objetivo de investigar a influência do sêmen congelado heterospermico e homospermico de touros, avaliados através de análise computadorizada (Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, EUA), integridade da membrana plasmática (IMP) e produção *in vitro* de embriões (PIV). Amostras seminais de oito touros da raça Nelore (homospermico = H) foram classificadas como tendo alta (HoA) e média congelabilidade (HoM), com base em avaliações anteriores (período de dois anos) e, também, na análise espermática, antes do processo de congelação. A partir desta classificação, as amostras de sêmen foram misturadas em duplas para formar o grupo heterospermico (HE). O sêmen foi diluído, refrigerado, congelado e armazenado em nitrogênio líquido (-196 °C) até ser utilizado para as análises e PIV. Dez parâmetros de movimento espermáticos, tais como: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade média de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), batimento cruzado (BCF, Hz), progressividade (STR, %), linearidade (LIN, %) e velocidade rápida (RAP, %), foram avaliados imediatamente após a descongelação (em banho-maria a 46 °C/20 s). A IMP foi avaliada utilizando corantes fluorescentes (6-diacetato carboxifluoresceína e iodeto de propídio), com os resultados expressos em porcentagem de espermatozoides intactos. Para a PIV, oócitos imaturos foram maturados e fertilizados e, posteriormente, monitorados para oócitos clivados, mórula/blastocisto (M/B) e blastocisto/blastocisto expandido/blastocisto em eclosão (B/Bx/Be), as 72, 144 e 168 h pós-inseminação. Não houve diferença significativa entre os grupos para as características de movimento espermático e IMP, apesar de diferenças estatísticas ($P < 0,05$) terem sido observadas dentro do grupo e entre os touros, independentemente do grupo. Os resultados para as taxas de clivagem e

percentuais de M/B e B/Bx/Be não diferiram entre grupos HoA, HoM e HE. Concluindo, sob estas condições experimentais, o sêmen heterospermico não melhorou qualquer característica espermática nem incrementou a produção de embriões bovinos *in vitro*, como evidenciado pelos resultados encontrados para todos os parâmetros avaliados. Esta pesquisa teve apoio parcial da Central de inseminação artificial VR e do frigorifico Frig, Araçatuba, SP.

Palavras-chave: homospermico; heterospermico; bovino; parâmetros espermáticos; produção *in vitro* de embrião

Abstract

This study was designed to investigate the influence of frozen heterospermic and homospermic bull semen, as evaluated by computer- assisted sperm analyzer (Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA), plasma membrane integrity (PMI) and in vitro embryo production (IVP). Sperm samples from 8 Nellore bulls (homospermic = H) were classified as having high (HH) or medium (MH) freezability, based on their previous evaluations (over a period of 2 years) and also on sperm analysis just before freezing process. From this classification, sperm samples were mixed in pairs to form the heterospermic group (HE). Semen was diluted, cooled, frozen, and then stored in liquid nitrogen (-196°C) until used for analysis and IVP. Ten sperm motion parameters, such as total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), average path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), straight line velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude of lateral head displacement (ALH, μm), beat cross frequency (BCF, Hz), straightness (STR, %), linearity (LIN, %), and rapid velocity (RAP, %) were assessed

immediately after thawing (in water bath at 46°C/20 s). PMI was evaluated using florescent dyes (6-carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide) and results taken as percentage of intact sperm cells. For IVP, immature oocytes were matured and fertilized, and subsequently monitored for cleaved oocytes, morula/blastocyst (M/B) and blastocyst/expanded blastocyst/hatching blastocyst (B/EB/HB) stages at 72, 144 and 168h post-insemination. There was no significant difference among groups for sperm motion characteristics and PMI, even though statistical differences ($P<0.05$) were observed within the group of bulls and all bulls, regardless of group. The results for cleavage rates and percentages of M/B and B/EB/HB did not differ among HH, HI, and HE. In conclusion, under these experimental conditions, heterospermic semen did not improve any sperm characteristic evaluated nor enhanced in vitro embryo production, as evidenced by the results found for all assessed parameters. This research was supported in part by VR Insemination Station and FRIG slaughterhouse, Araçatuba, SP, Brazil.

Keywords: homospermic; heterospermic; bovine; sperm parameters; in vitro embryo production

1. Introdução

A inseminação artificial (IA) é uma importante ferramenta dirigida ao melhoramento genético do rebanho, entretanto, para sua aplicação em larga escala é indispensável o uso de sêmen congelado. Porém, a baixa eficiência reprodutiva, em bovinos, pode ser proveniente do touro [1] e, desta forma, diversas pesquisas têm sido realizadas na tentativa de maximização da fertilidade do sêmen disponibilizado para a IA.

À parte da seleção de reprodutores, com base na fertilidade, em nível de campo [2] ou através de pesquisas visando à identificação de enzimas [3] e proteínas relacionadas com fertilidade do sêmen [4, 5], tais investigações têm sido, principalmente, dirigidas à melhoria dos meios de congelação de sêmen [6-7] ou, ainda, dos procedimentos relacionados ao processo de congelação e descongelação [8].

De modo usual, a IA é realizada com o sêmen de um único macho, caracterizando uma inseminação homospérmica e, sendo assim, milhares de inseminações são necessárias para comparar com precisão a fertilidade entre dois reprodutores. Por outro lado, a inseminação com sêmen heterospérmico (SH), a qual compreende a mistura de sêmen de diferentes machos, tem sido rotulada como muito vantajosa, em diferentes espécies [9-12].

A avaliação do potencial fertilizante do sêmen na IA independente de diferenças na libido, desempenho à monta e do número de espermatozóides no ejaculado [10]. Segundo Berger e Dally [13] a IA com sêmen heterospérmico reduz os efeitos da variabilidade da fêmea.

O uso de SH permite avaliar a fertilidade do macho de uma forma exata e rápida, necessitando menos do que 40 fêmeas [12]. Kushner [14] relatou distintos méritos que podem ser obtidos, a partir do uso SH, tais como: o aumento das taxas de concepção, maior peso ao nascimento e rápido crescimento.

Outros autores têm relatado o aumento da fertilidade [15-9-1]. A combinação de ejaculados de diferentes reprodutores, em uma única dose, pode ser utilizada para melhorar a fertilidade de amostras de sêmen, potencializando os ganhos com fertilidade [16]. Entretanto, quando espermatozóides de dois ejaculados, em uma inseminação heterospérmica são de igual habilidade fertilizante, cada macho será responsável por aproximadamente 50% dos descendentes [17].

Albrecht et al. [18], testando duas diferentes concentrações de espermatozóides (12×10^6 e 28×10^6 , por palheta), através de inseminações heterospermicas, com mistura de sêmen de dois touros, observaram diferença significativa nas taxas de prenhes (61 vs. 69%, respectivamente), após inseminação artificial em tempo fixo.

Em suínos, [19], investigando a habilidade do espermatozóide suíno se ligar a zona pelúcida (ZP), observaram que a inseminação heterospermica foi efetiva em classificar a fertilidade do cachão.

Contudo, [20-21] não conseguiram demonstrar as mesmas vantagens, não observando aumento significativo na taxa de prenhes, quando inseminações com SH de dois touros foram comparadas com inseminação homospérmica. Todavia, de acordo com o relato de [22], a fertilidade individual do SH de touros foi afetada pelo processo de congelamento.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, como forma para disponibilizar aos pecuaristas tecnologia que possa permitir o aumento da taxa de concepção, aprovou a regulamentação para a produção e comercialização de SH de ruminantes, permitindo que ejaculados de até cinco animais possam ser misturados e processados. No entanto, o SH comercializado no Brasil, ainda, é proveniente de importações por parte das centrais de IA, com relato de aumento de 6 a 9% nas taxas de concepção [23]

O SH tem sido indicado principalmente para IA de vacas de corte, todavia, nenhum relato de pesquisas sobre a produção de SH, no Brasil, foi encontrado na literatura. A investigação da eficácia desse procedimento, com sêmen de reprodutores nacionais, mais especificamente da raça Nelore, reveste-se de grande importância, visto ser essa raça de eleição para a produção de carne.

Assim, com base na escassez de publicações, resultados conflitantes e interesse econômico, este estudo foi desenvolvido com o objetivo de se comparar o sêmen homospermico e heterospermico de amostras seminais de alta e média congelabilidade, através da avaliação dos parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*, mediante análise computadorizada (CASA) e de integridade de membrana plasmática (IMP), em touros da raça Nelore, bem como verificar possíveis correlações entre as variáveis espermáticas avaliadas através da técnica CASA.

2. Material e Método

2.1. Animais e colheita do sêmen

Os animais do experimento, mantidos em regime de colheita de sêmen em Central de Inseminação Artificial, foram selecionados com base nos resultados de congelabilidade do sêmen, definida, a partir do histórico de motilidade (M) e vigor (V), e dos dados de pré-congelação.

Assim, os reprodutores foram classificados como tendo sêmen de alta ($M \geq 50\%$; $V \geq 3$) e de média ($M = 40-45\%$; $V = 3$) congelabilidade. Somente amostras com no mínimo 60% de motilidade, vigor ≥ 3 e células normais $\geq 70\%$ (sendo no máximo 30% de defeitos totais e 15% de maiores) foram utilizadas para a congelação (Tabela 1).

Oito touros da raça Nelore, sendo quatro portadores de sêmen de alta congelabilidade (Vo, Bo, Ca, Ke) e quatro de média congelabilidade (Ac, As, Ch, Av), constituíram, respectivamente, os grupos homospermicos (HoA e HoM) e heterospermico (He), este último, através da combinação de amostras seminais de dois touros (Bo/Ac, Vo/Ch, Av/Ca, Ke/As).

Um total de 40 ejaculados, cinco de cada touro, foram colhidos através de vagina artificial e 25 doses de cada colheita e de cada reprodutor foram congeladas e armazenadas, para posterior análise *in vitro*.

Os ejaculados de touros dos grupos HoA e HoM foram divididos em duas alíquotas, antes congelação, sendo uma para o procedimento habitual, ou seja, partidas com sêmen homólogo (grupos homospérmicos) e a outra, em combinação, para constituir o grupo He.

2.2. Avaliação espermática pré-congelação

As amostras de sêmen foram pesadas (balança, Marte[®], AL 200-C, Brasil), para cálculo do volume do ejaculado, segundo [24]. A motilidade e o vigor espermático foram observados em microscópio de contraste de fase (Carl Zeiss[®], Alemanha), ao aumento de 200 x. A concentração espermática foi obtida através de espectrofotômetro (Accucell[®], IMV, França) e a morfologia observada em microscópio de contraste de fase (Olympus[®], Japão), em aumento de 1.000 x.

2.3 Diluição, resfriamento e congelação das amostras

O meio de congelação TRIS-frutose-ácido cítrico, com gema (20%) e glicerol (7%), foi empregado para o processamento das amostras, sendo preparado em duas frações (A e B) de igual composição, sendo a fração A desprovida de glicerol, porém com antibióticos, e a fração B com glicerol e sem adição de antibióticos.

As amostras foram pré-diluídas (10 mL de diluente) com a fração A (35 °C), em frasco de 200 mL, o qual foi colocado em recipiente com água a 34 °C e levado para o balcão refrigerado para resfriamento até 5 °C. Ao atingir 5 °C, o restante da fração A foi

adicionado e, em seguida, o volume total da fração B (a 5 °C), permanecendo por mais 4 horas, antes da congelação. A concentração espermática final foi ajustada para 60×10^6 espermatozoides/mL, correspondendo a 30×10^6 /palheta.

Após o período de equilíbrio, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL (IMV, França), em equipamento automático (MRS1, IMV, França). As rampas com as palhetas foram, então, colocadas em congelador programável (Digitcool[®], IMV, França), a 4 °C. O programa de congelação seguiu a seguinte curva de temperatura/tempo: de 4 °C a -10 °C (5 °C/min.), de -10 °C a -100 °C (40 °C/min.) e de -100 °C a -140 °C, a 20 °C/min., totalizando oito minutos. A seguir, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido, raqueadas e armazenadas em botijão isotérmico até o momento das análises.

2.4. Análises espermáticas pós-descongelação

2.4.1. Avaliação da cinética dos espermatozoides

As amostras de sêmen foram submetidas à análise computadorizada (Hamilton Thorne Research[®], Ivos-10, EUA). Após descongelação, em banho-maria a 46 °C por 20 s, as amostras foram colocadas em câmara de Makler, pré-aquecida (37 °C), sendo observados cinco campos aleatórios e no mínimo 150 espermatozoides por campo. Os seguintes parâmetros de foram avaliados: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), linearidade (LIN, %), progressividade (STR, %) e rapidez (RAP, %).

2.4.2. Integridade de membrana plasmática

As amostras seminais foram avaliadas, quanto a IMP, através do emprego de sondas fluorescentes, diacetato de 6-carboxi-fluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI), conforme metodologia descrita por [25]. Resumidamente, a solução corante de CFDA (0,8 µL) e PI (5 µL) foi adicionada ao sêmen e incubada a 37 °C, por 15 minutos, sendo, a seguir, colocado em solução de glutaraldeído (0,2%); uma amostra de 4-5 µL foi colocada sobre lâmina/lamínula, aquecidas, e examinadas em microscópio de fluorescência, ao aumento de 1.000 x.

2.5. Produção de embriões *in vitro*

Ovários de vacas abatidas em frigorífico foram transportados em garrafa térmica contendo solução fisiológica, à temperatura de 31 a 33 °C. Folículos de 2-7 mm de diâmetro foram aspirados, sendo os oócitos lavados e selecionados em meio de maturação base (MM-b), constituído de Meio 199, acrescido de 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 0,05 mg/mL de piruvato de sódio, 0,05 mg/mL de sulfato de gentamicina e 1 mg/mL de álcool polivinílico (PVA). Somente oócitos com citoplasma homogêneo e pelo menos 3-4 camadas de células do *cumulus* foram utilizados.

A seguir, 15 a 20 oócitos foram distribuídos, aleatoriamente para gotas (100 µL) de MM-b, sem PVA, mas com a adição de 1 µg/mL de FSH (Pluset[®], Serono), 5 µg/mL de LH (Lutropin[®], Bionche) e 10% de soro fetal bovino (SFB[®], Nutricell), em estufa a 5% de CO₂, a 38,5 °C, por de 24 horas.

Para a realização da FIV, uma dose de sêmen foi descongelada a 37 °C por 30 s e centrifugada em gradiente Percoll (45% e 90%; Nutricell[®], Campinas, Brasil) a 700 g, durante 20 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido, os espermatozóides re-suspendidos em 3 mL de meio TALP e centrifugados (250 g), por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” diluído em 50 µL de meio FIV (TALP + PHE + heparina). Posteriormente, foi realizada a contagem espermática em câmara de Neubauer (5 µL da suspensão de espermatozóides em 95 µL de solução formol-salina), bem como avaliada a motilidade e o vigor.

Grupos de 20 oócitos foram coincubados com espermatozóides (concentração final de $1,0 \times 10^6/\text{mL}$ x motilidade), em gotas de meio FIV, sob óleo mineral, em atmosfera úmida a 5% de CO₂, em ar, a 38,5 °C, por 20 h.

Ao término da etapa de inseminação, as células do *cumulus* foram removidas parcialmente, através de sucessivas pipetagens e os prováveis zigotos, em grupos de 20, transferidos para gotas (100 µL) de meio de cultura SOF-m (modificado). Decorridas 72 horas pós-inseminação (hpi), a clivagem foi verificada e 50% do meio de cultura foi substituído por meio fresco, sendo o procedimento repetido novamente às 120 hpi. A etapa de cultura foi realizada sob as mesmas condições descritas para MIV e FIV.

O desenvolvimento embrionário foi monitorado para verificar os oócitos maturados que fertilizaram e alcançaram os estágios de mórula/blastocisto (Mo/Bl) e blastocisto/blastocisto expandido/blastocisto em eclosão (Bl/Bx/Be) às 72, 144 e 168 hpi, respectivamente.

2.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa SAS (SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.2.). Os dados das análises espermáticas foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias, com as respectivas médias comparadas pelo teste de Tukey. Os resultados de PIV foram analisados através de ANOVA, para verificar diferenças estatísticas, e do teste *t* de Bonferroni, para determinar diferenças entre os grupos de tratamento. Diferenças de $P < 0,05$ foram consideradas como significativas. O coeficiente da correlação de Pearson foi utilizado para verificar correlações entre as variáveis espermáticas analisadas pela técnica CASA. Análise de correlação linear de Pearson foi utilizada para verificar correlação entre as variáveis estudadas.

3. Resultados

Sêmen homospérmico e heterospérmico foram avaliados com a finalidade de se verificar possível influência sobre as características espermáticas. Não houve diferença significativa para as variáveis seminais entre os grupos He, HoA e HoM (Tabelas 2, 3, 4 e 5). Os valores da média variaram de 65,05 a 68,75 (MT), 46,50 a 48,55 (MP), 87,63 a 89,54 (VAP), 69,81 a 71,49 (VSL), 143,49 a 146,26 (VCL), 5,73 a 5,92 (ALH), 27,80 a 28,73 (BCF), 79,70 a 80,50 (STR), 50,85 a 51,95 (LIN), 61,75 a 65,50 (RAP) e de 31,53 a 36,25 (IMP). Não houve influência do sêmen sobre as características espermáticas, independentemente do grupo.

Contudo, diferenças estatísticas ($P < 0,05$) foram observadas para determinadas médias dos parâmetros do sêmen entre os touros e os grupos de tratamento. Mais variáveis espermáticas (MT, MP, VCL, ALH, BCF, STR, LIN, RAP e IMP) diferiram

estatisticamente, entre os touros, dentro do grupo HoM, em comparação com os grupos He (VSL, VCL, ALH, STR e LIN) e HoA (VSL e ALH).

Assim, no grupo HoM, os piores resultados, em termos da análise computadorizada do sêmen (MT, MP, ALH, BCF, LIN, RAP) e IMP foram obtidos para o touro As em comparação com os touros Ac, Ch e Av, com melhores resultados sendo observados para os touros Ac e Ch.

Em relação ao grupo HoA, os reprodutores Vo e Ke apresentaram resultados inferiores para as variáveis VAP e VSL, enquanto que os touros Bo e Ca foram ligeiramente superiores ao demais animais. Considerando-se, os touros do grupo He, a combinação Ke/As produziu os resultados mais insatisfatórios, em comparação com os touros Bo/Ac e Av/Ca.

Porém, um número, ainda, maior de variações da média foi constatado, quando se compararam os valores obtidos para todos os touros e, sendo assim, as análises espermáticas caracterizaram os reprodutores As e Vo/Ch como tendo os piores e melhores resultados, respectivamente.

Os resultados de oócitos que fertilizaram e alcançaram os estágios de Mo/Bl e Bl/Bx/Be estão descritos na Tabela 7. Nenhuma diferença significativa foi observada na taxa de fertilização entre os grupos He (89,20%), HoA (84,52%) e HoM (90,03%). Maior porcentagem ($P < 0,05$) de Mo/Bl foi obtida no grupo He (53,31%) do que no grupo HoA (38,00%) e de Bl/Bx/Be no grupo HoM (47,54%), em comparação com o grupo HoA (31,82%); entretanto, as porcentagens de embriões no grupo HoM (52,54%) e He (42,53%) às 144 e 168 hpi, respectivamente, não diferiram dos demais grupos.

Após 196 hpi em cultura, diferentes estágios de blastocistos foram obtidos nos grupos He (Fig. 1), HoA (Fig. 2) e HoM (Fig. 3).

4. Discussão

Desde o primeiro relato de sucesso da congelação de sêmen de touro [26], poucos avanços foram feitos e incorporados ao procedimento de criopreservação de espermatozóides bovinos, dentre esses, tentativas de se retirar a gema de ovo de meios destinados à preservação de sêmen de touro [27, 28, 29, 6, 7] têm sido as mais estudadas. Considerando que a fertilidade é resultado do acasalamento, uma mais baixa eficiência reprodutiva, em bovinos, pode ser proveniente do touro [1]. Segundo esse autor, a fertilidade aumentou quando inseminações com sêmen heterospérmico foram utilizadas.

Neste trabalho, não foram realizadas inseminações com sêmen heterospérmico, entretanto, análises espermáticas *in vitro*, através da avaliação computadorizada do sêmen, não detectaram nenhuma diferença significativa entre os parâmetros espermáticos e os grupos HoA, HoM e HE. Porém, uma grande diversidade nos resultados foi observada entre touros, evidenciando a individualidade entre os animais, independentemente do grupo. Dados de literatura sobre o sêmen heterospérmico e homospérmico são limitados, tornando comparações difíceis. Entretanto, de modo geral, nossos resultados foram concordes com os de [20], [21], [16], os quais não conseguiram demonstrar nenhuma vantagem na utilização de sêmen heterospérmico.

Segundo Sacke [17], quando espermatozóides de dois ejaculados, em uma inseminação heterospérmica são de igual habilidade fertilizante, cada macho será responsável por aproximadamente 50% dos descendentes. Contudo, a finalidade do uso de SH reside no fato de se buscar distinguir touros, cujo ejaculado sobressaia sobre o de outros, resultando em maiores taxas de concepção para um determinado reprodutor. No Brasil, [23] estima um aumento de 6 a 9% na taxa de concepção de vacas, mediante

emprego de SH, porém, sem citar referências na literatura. Trabalhos com SH não têm sido realizados e/ou publicados, no país, ressaltando, ainda mais, o caráter inédito da presente investigação, principalmente em se tratando da raça Nelore, a qual domina a pecuária de corte nacional.

Kushner [14] relatou distintos méritos que podem ser obtidos a partir do uso SH, tais como: o aumento das taxas de concepção, melhor peso ao nascimento e rápido crescimento; resultados similares foram reportados por [15], observando que a utilização do SH pode aumentar a fertilidade em comparação com o sêmen homospérmico. [9] observaram diferenças no número de descendentes, quando espermatozóides de quatro touros foram misturados em igual número, sendo que um único touro produziu 50% da progênie. [18] testando duas diferentes concentrações de espermatozóides (12 e 28 milhões, por palheta), em inseminações heterospérmicas, com dois touros, observaram diferença significativa nas taxas de prenhes (61 vs. 69%, respectivamente).

Thun et al. [29] relataram que a mistura do sêmen de dois ou mais cachacos, seguida de IA, direcionou os produtos nascidos em favor de um único macho, sem nenhuma explicação satisfatória para esse fato; entretanto, para alcançar o oócito, os espermatozóides precisam entrar no oviduto, onde estarão expostos a fatores que modulam sua atividade. Collin, et al. [19], investigando a habilidade do espermatozóide suíno se ligar a zona pelúcida (ZP), observou que a inseminação heterospérmica foi efetiva em classificar a fertilidade do cachaco, entretanto, essa habilidade de se ligar a ZP não foi correlacionada significativamente com o número de leitões por leitegada. García-Álvarez et al. [30] demonstraram que a fertilização *in vitro* com sêmen heterólogo de carneiro pode ser valiosa na predição da fertilidade do espermatozóide.

Como de conhecimento geral, a avaliação do potencial de fertilidade do sêmen é muito importante antes de sua utilização na IA ou PIV [30], contudo, a relação entre os parâmetros espermáticos e a fertilidade *in vivo* apresenta resultados controversos [31]. Diversos métodos para a análise do sêmen *in vitro* avaliam características gerais do espermatozóide (motilidade, IMP, integridade de organelas, integridade do DNA, entre outras), todas consideradas essenciais para a fertilidade [32].

Um grande número de dados suporta a hipótese de que ejaculados de mamíferos constituem uma população heterogênea de espermatozóides, dentro da qual diferentes subpopulações coexistem [33]. Tal heterogeneidade torna possível ao trato genital feminino exercer múltiplos processos seletivos, os quais reduzem a população de milhões para poucos espermatozóides competentes [34]. Essas diferentes subpopulações têm sido estudadas principalmente no sêmen de equino [35], suíno [33] e canino [36], no qual foi possível identificar e quantificar subpopulações de espermatozóides com específicos padrões de movimento.

A técnica de CASA é uma valiosa ferramenta para uma avaliação objetiva da cinética espermática [37]. Utilizando essa técnica, [38], demonstraram que a motilidade espermática diferiu entre touros das raças Azul Belga e Holandês, observando uma maior proporção de espermatozóides vivos, com motilidade total e prgressiva, em ejaculados de touros da raça Holandês. Relataram, ainda, uma baixa eficiência de movimento espermático em touros da raça Azul Belga, evidenciada por um reduzido valor de BCF combinado com um elevado valor de ALH, postulando que estas diferenças podiam estar relacionadas com a morfologia espermática; concluíram, sugerindo que um componente genético pode ser o responsável pelas diferenças no movimento espermático entre as duas raças.

Milligan [39] observaram que espermatozóides de homens férteis e inférteis poderiam ser distinguidos com base nas medidas de velocidade espermática. Em alguns estudos, medidas de velocidade do espermatozóide têm sido correlacionadas com penetração em oócitos desprovidos de ZP, tanto em humanos quanto em hamster [40].

Em touros, comparações são mais complicadas, pois o sêmen apresenta grande variação [37], diferindo muito em todas as variáveis relacionadas com a motilidade e velocidade. Entretanto, ainda que uma ampla variação exista entre os animais, combinações da motilidade e velocidade têm sido altamente correlacionadas com a fertilidade (0,87) aos 59 dias do não retorno ao cio [41]. Esses autores relataram, ainda, que, quando diversas variáveis foram coletivamente correlacionadas com fertilidade, altos valores de R^2 foram obtidos, sugerindo que a fertilidade potencial do touro pode ser estimada a partir da qualidade do movimento espermático.

No presente trabalho, várias correlações foram observadas entre as principais características analisadas pela CASA, o mesmo sendo relatado por inúmeros pesquisadores. Assim, correlações entre o número total de espermatozóides móveis inseminados, VCL e fecundação [42], VCL e FIV [43], progressividade e linearidade [44], ALH e taxas de fertilização [44, 45], linearidade do movimento espermático e fertilidade, em nível de campo [41] e VCL, bem como entre VSL e número total de espermatozóides com a taxa de concepção [37]. Os parâmetros de velocidade podem ser mais úteis do que a porcentagem de espermatozóides móveis na predição da fertilidade do sêmen de touro [46], porém, [47] reportaram como valor mínimo 50% de motilidade total.

A ALH e a frequência de rotação da célula refletem o vigor do batimento flagelar, [48], sendo provavelmente fundamentais para a progressão do espermatozóide dentro do muco cervical e envelope perioócito. Considerada como importante característica do

espermatozóide, a ALH afeta a habilidade de espermatozóides humanos penetrarem no muco cervical e fundir com o oócito [49].

Toda a estrutura especializada do espermatozóide está voltada para sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético, contido no núcleo do espermatozóide, para o oócito, propiciando a união dos pró-núcleos e formação do zigoto [50]. Neste estudo, não foi detectada diferença significativa entre os resultados de integridade de membrana plasmática e os grupos, com médias ao redor de 34% de células intactas. Esse resultado é similar ao relatado por [25], ao redor de 38%, o qual utilizou a mesma metodologia para avaliação da IMP, sendo inferior (46,4%) ao reportado por [51], obtido através de teste hiposmótico. Os danos causados nas membranas espermáticas promovem a perda de componentes celulares, diminuindo a viabilidade e motilidade pós-descongelamento [52]. A manutenção da IMP parece estar mais intimamente relacionada com a fertilidade do sêmen do que com a motilidade, mas somente quando um grande número de espermatozóides é contado [53].

Inúmeros testes funcionais *in vitro*, visando avaliar diretamente a capacidade fertilizante do espermatozóide, têm sido desenvolvidos, entre eles o da penetração em muco cervical [54, 55], o da habilidade de se ligar à ZP [56, 19] e o da penetração em oócitos homólogos [6] ou heterólogos [30]. No presente estudo, as taxas de fertilização *in vitro* obtidas nos três grupos foram similares. De acordo com [57], a taxa de clivagem, após a fertilização *in vitro*, é o melhor teste disponível para expressar a fertilidade, pois requer espermatozóides móveis, com morfologia normal e capacidade para ativar o oócito [58], permitindo, também, a avaliação das interações entre oócito e espermatozóide à fertilização, bem como o monitoramento das fases iniciais do desenvolvimento embrionário [30]. Em condições *in vivo*, a seleção espermática está

diretamente relacionada com a qualidade do espermatozóide. Segundo [59] e [60], somente a taxa de clivagem apresentou correlação com a fertilidade de touros *in vivo*.

No entanto, os resultados da relação entre as taxas de fertilização *in vitro* e fertilidade têm sido variáveis, provavelmente, em decorrência da variabilidade entre lotes de oócitos, manuseio do sêmen e manipulação laboratorial [58]. Os resultados de produção de embriões, a partir das 144 hpi, de modo geral, foram similares entre os grupos, contudo, maiores porcentagens ($P < 0,05$) de Mo/Bl foram obtidas no grupo He do que no HoM e de Bl/Bx/Be, no grupo HoM, em comparação com o HoA. Os achados de maior produção de blastocistos provavelmente estão relacionados às condições de cultura dos embriões [59, 60]. O uso de diferentes touros (“pool” de sêmen heterólogo) na FIV, em diferentes tipos de ensaios na PIV, tem sido empregado com finalidade de se evitar possíveis variações nos resultados, devido ao efeito touro.

Porém, diversos pesquisadores [61-65] têm relatado que tanto a taxa de clivagem como a de formação de blastocistos pode ser utilizada como ferramenta para prever a fertilidade de um touro, em nível de campo, ou distinguir entre touros com diferentes fertilidades. Carvalho [66] não constataram diferenças na taxa de fertilização e de formação de blastocistos em estudo comparando o sêmen congelado sexado com o sêmen não sexado, contudo, [2] empregando técnicas de penetração em muco e de PIV embriões, para avaliar o sêmen de touros classificados como tendo alta (AF) ou baixa fertilidade (BF), em nível de campo, observaram que, espermatozóides de touros AF foram mais efetivos em penetrar o muco artificial e fertilizar os oócitos, embora a taxa de produção de embriões tenha se mantido similar entre os dois grupos de touros.

Concluindo, não houve influência benéfica do sêmen heterospermico sobre os parâmetros espermáticos, avaliados através da técnica de análise computadorizada do sêmen, integridade de membrana plasmática e taxas de fertilização *in vitro* e nem na

formação de blastocistos, em comparação com o sêmen homospérmico, de alta ou média congelabilidade, contudo, grande variação ocorreu entre os touros independentemente do grupo. Da mesma forma, inúmeras correlações foram observadas entre a maioria das variáveis estudadas.

Referências

- [1] AZMAL, S.A.; AMIN, M.R.; GOSWAMI, P.C.; MOSTARI, M.P. KHATUM. R. Relative merits of Homo and Heterospermic bull semen in respect of fertility. Pakistan Journal Biological Science 2004; 7: 1912-1917.
- [2] NAIB, A.; HANRAHAN, J.P.; LONERGAN, P.; FAIR, S. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. Disponível: www.sciencedirect.com Theriogenology, In press, 2011.
- [3] STRADAIOLI, G.; SYLLA, L.; MONACI, M.; MAIORINO, M. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in Bull spermatozoa provides a unique marker in the quest for semen quality analysis. Theriogenology 2009; 72: 91-98.
- [4] KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. Biology of Reproduction, , 1993; 49: 1202-1207.
- [5] BIANCHI, I.; COLLARES, T.; CAMPOS, V.P.; CAVALCANTI, P.V.; KAEFER, C.; CORRÊA, E.K.; DELLAGOSTIN, O.A.; LUCIA JÚNIOR, T.; DESCHAMPS, J.C.; CORREA, M.N. Fator do plasma seminal associado à integridade de membrana de espermatozóides suínos pós-descongelamento. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008: 60: 384-388.
- [6] AIRES, V.A.; HINSCH, K.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. Theriogenolog 2003; 60: 269-279.

- [7] AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl[®], a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 2004; 6: 895-90.
- [8] TANAJURA NETO, J.A.; MARTINS Jr. A.; CALEGARI, R.S.; SILVA. C.; CRESPILOHO, A.M. Effects of seminal plasma removal on spermatological motion and in vitro embryo production. *Reproduction and Biotechnology* 2008;213.
- [9] STEWARD, D.L.; SPOONER, R.L.; BENNET, G.H.; BEAUTTY, R.A.; HANCOCK, J.L. A second experiment with heterospermic insemination in cattle. *Journal Reproduction and Fertility* 1974; 36:107-116.
- [10] BERGER, T. Proportion of males with lower fertility spermatozoa estimative from heterospermic insemination. *Theriogenology* 1995; 43: 769-775.
- [11] DZIUK, P.J. Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination. *Animal Reproduction Science* 1995; 43: 65-88.
- [12] FLINT, A.F.; CHAPMAN, P. L.; SEIDEL Jr., G.E. Fertility assessment through heterospermic insemination of flow-sorted sperm in cattle. *Journal Animal Science* 2003;81: 1814-1822.
- [13] BERGER, T.; DALLY, M. Do sire-ram interactions contribute significantly to fertility comparisons in heterospermic inseminations trials. *Theriogenology* 2001;56: 535-543.
- [15] BEATTY, R.A. An experiment with heterospermico insemination in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 1969: 19: 491-502.
- [16] NELSON, L.D.; PICKETT, B.W.; SEIDEL Jr., G.E. Effect of heterospermic insemination on fertility of cattle. *Journal Animal Science* 1975; 40: 1124-1129.
- [17] SAACKKE, R.G. Semen quality in relation to semen preservation. *Journal Dairy Science* 2008; 66: 2635-2644.

- [18] ALBRECHT, A.; GAVIA, R.; MIGLIARO, F.G.; BROGLIATTI, G. Heterospermic insemination at two sperm concentrations in timed AI: CASA semen parameters and pregnancy rates, 2005; 17(2): 154.
- [19] COLLINS, E.D.; FLOWERS, W.L.; SHANKS, R.D.; MILLER, D.J. Porcine sperm-zona binding ability as an indicator of fertility. *Animal Reproduction Science* 2008; 104: 69-82.
- [20] BEATTY, R.A. Relation between genetic constitution of an offspring and weight of its litter-mates. *Nature* 1956 ;178: 48.
- [21] FRAPPELL, J.P.; WILLIAMS, G. A study of heterospermico insemination in cattle. *Proc.III. Congre. Animal Reproduction. Cambridge* 1956: 65-67.
- [22] BEATTY, R.A. Evaluaton by the heterospermic insemination technique of the differential effect of freezing at -196°C on fertility of individual bull semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 1976; 47: 377-379.
- [23] ABS Pecplan, disponível em: <http://www.abspecplan.com.br/catalogos/fertilityplus2012>
- [24] CALEGARI, R.S.; ROSSETO, M.R.; MARTINS Jr., A.; PASCHOAL, D.M. Método alternativo para determinação do volume do sêmen obtido de touros da raça Nelore. *Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*, 31., 2004, São Luis. *Anais..... São Luiz*: 89.
- [25] BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; PANICH, P.L.; JOHN, P.K. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology* 2003; 60: 1539-1551.
- [26] POLGE, C.; MINOTAKIS, C. Deep freezing of jackass and stallion semen. *Proc. Int. Animimal Reproduction Artificial Insemination* 1964; 5: 545-552.
- [27] MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M.; Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 2002; 57: 1695-1706.
- [28] THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparision of Biociphos-plus and tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* 2002; 57: 1087-1094.

- [29] SATAKE, N.; ELLIOT, R.M.A.; WATSON, P.F.; WILLIAM, V.H. Sperm selection and competition in pigs may be mediated by the differential motility activation and suppression of sperm subpopulations within the oviduct. *Journal of Biology* 2006; 209: 15160-1572.
- [30] GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ESTEO, M.C.; SOLER, A.J. Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 2009; 71:643-650.
- [31] RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; BARTH, A.D. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Society Reproduction Fertility* 2007; 64: 34-59.
- [32] MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; ESTESO, M.C.; MONTORO, V. Mitochondrial activity forward scatter vary in necrotic, apoptotic and membrane intact spermatozoa subpopulations. *Reproduction Fertility and Development* 2008; 20: 547-556.
- [33] ABAIGAR, T.; WOLT, W.; HARRISON, R.; DEL BARRIO, G. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Reproduction* 1999; 122: 265-273.
- [34] HOLT, W.W.; VAN LOOK, K.J.W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* 2004; 127: 527-535.
- [35] QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; RIGAU, A.T.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 2003; 59:1973-1990.
- [36] NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORAN, J.M.; PÉÑA, F.J. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reproduction Animal Domestic* 2006; 41: 527-535.
- [37] VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analysers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002; 57:149-179.
- [38] HOFLACK, G.; OPSOMER, G.; MAES, D.; KRUIF, A. Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian and Holstein-Friesian bulls. *Reproduction Domestic Animal* 2007; 42:153-161.

- [39] MILLIGAN, M.P.; HARRIS, S.; DENNIS, K.J. Comparison of sperm velocity in fertile and infertile groups as measured by time-lapse photography. *Fertility Sterility* 1980; 34:509-551.
- [40] FETTERHOLF, P.M.; ROGERS, B.J. Prediction of human sperm penetrating ability using computerized motion parameters. *Molecular Reproduction Development* 1990; 27: 326-331.
- [41] FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C; FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analyses (CASA) and relationship to fertility. *Theriogenology* 1998; 49: 871-879.
- [42] BYRD, W.; BRADSHAW, K.; CAR, B.; EDMAN, C.; ODOM, J. A prospective randomized study of pregnancy rates following intrauterine and cervical insemination using frozen donor semen. *Fertility Sterility* 1990; 53: 521-527.
- [43] CHANG, M.C. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature*, v. 179, p. 258-260, 1957.
- [44] SUKCHAREN, N.; KEITH, J.; IRVINE, D.S. Predicting the fertilizing potencial of human sperm suspensions *in vitro*: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. *Fertility Sterility* 1995; 63: 293-300.
- [45] JEULIN, C.; LEWIN, L.M.; CHEVRIER, C. Changes in flagellar movement of rat spermatozoa along the length of the epididymis: Manual and computer-aided image analysis. *Cell Motility Cytoskeleton* 1996; 35: 147-161.
- [46] TARDIF, A.L.; FARREL, P.B.; FOOTE, R.H. Computer-Assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *Journal of Dairy Science* 1997; 80: 1606-1612.
- [47] ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIN, N.; HÄÄRD, M.G.H.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. "Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme", *International Journal of Andrology*, 1999; 22: 253-260.
- [48] DAVID, G.; SEVERS, S.; JOUANNET, P. Kinematic of human spermatozoa. *Gamete Research* 1981; 4: 83-86.

- [49] AITKEN, R.J.; FISHER, H. Relative oxygen generation by human spermatozoa. *Bioassays* 1994; 16: 259-268.
- [51] AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl[®], a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 2004; 61: 895-907
- [52] SEVERO, N.C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. *A Hora Veterinária* 2009; 28: 36-39.
- [53] PĚNA, F.J.; SARAIVA, F.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Detection of early changes in sperm membrane integrity pré-freezing can estimate post-thaw quality of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2006: **v e p**
- [54] SHARARA, F.I.; ILLIONS, E. H.; CODDINGTON, C.C. Evaluation of the Tru-Trax cervical mucus penetration test in predicting fertilization and pregnancy rates in vitro-fertilization. *Human Reproduction* 1995; 10: 1481-1485.
- [55] O'HARA, L.; HANRAHAN, J.P.; RICHARDSON, L.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; EVANS, A.C.; LONERGAN, P. Effect of storage duration, store temperature, and diluents on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology* 2010; 73:541-549.
- [56] ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of batches of bovine oocytes on the outcome of ram intact zona pellucid binding assay and in vitro fertilization. *Int. J. Androl.* 1995;18:213-220.
- [57] AMANN, R.F.; HAMMERSTEDT, R.H. Detection of differences in fertility. *Journal Andrology* 2002; 60:1539-1551.
- [58] BRAUDMEIER, A.G.; DEMERS, J.M.; SHANKS, R.D.; SAACKER, R.G.; MILLER, D.J. Examination of the binding ability of bovine spermatozoa to the zona pellucid as an indicator of fertility. *Journal of Andrology* 2002; 23: 645-651.
- [59] KURT, J.M.; AMBROSE, J.D.; RAJAMAHENDRAN, R.; Cleavage rate of bovine oocytes in vitro is affected by bulls but not sperm concentration. *Theriogenology* 1996; 45: 257-262.

- [60] KREYSING, U.; NAGAI, T.; NIENAMAN, H. Male-dependent variability of fertilization and embryo development in two bovine in vitro fertilization system and the effects of casein phosphopeptides (CPPs). *Reproduction Fertilization Development* 1997; 9: 465-475.
- [61] MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. "Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization tests. *Reproduction Nutrition Development* 1975; 30: 259-266.
- [62] HILLERY, F.L.; PARRISH, J.J.; FIRST, N.L. Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. *Theriogenology* 1990; 33: 249-255.
- [63] ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIN, N.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Relationship between embryo development in vitro and 56 day non-return rates of cows inseminated with froze-thawed semen from dairy bulls. *Theriogenology* 1997; 48: 221-231.
- [64] WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M.; LONERGAN, P.; Paternal influence on time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Molecular Reproduction Development* 2001; 31: 1575-1584.
- [65] WARD, F.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology* 2003; 59: 1575-1584.
- [66] CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; MACHADO, G.M.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology* 2010; 74: 1521-1530.

Anexos

Tabela 1

Estatística descritiva (média e desvio padrão) das variáveis espermáticas pré-congelação (sêmen fresco) para os grupos homospérmicos e touros.

Grupo	Touro	Concentração (milhões/mL)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	DM (%)	Dm (%)	Normais (%)
HoA	Vo	1146 ± 169,1	78 ± 8,37	5 ± 0	5,0 ± 1,0	5,4 ± 1,34	89,6 ± 1,52
	Bo	1062 ± 241,5	76 ± 10,84	5 ± 0	4,6 ± 1,14	6,4 ± 0,55	89 ± 1,22
	Ca	936 ± 431,5	77 ± 4,47	5 ± 0	3,2 ± 0,84	3,2 ± 0,84	93,6 ± 0,55
	Ke	756 ± 203,2	71 ± 5,48	5 ± 0	4,8 ± 1,1	5,6 ± 0,89	89,6 ± 1,34
	Média	975 ± 298,2 ^a	75,5 ± 7,59 ^a	5 ± 0 ^a	4,4 ± 1,19 ^b	5,2 ± 1,5 ^b	90,4 ± 2,19 ^a
HoM	Ac	878 ± 180,2	65 ± 0	4 ± 0	13 ± 1,14	12 ± 1,48	74,4 ± 1,52
	As	1026 ± 341,0	63 ± 2,74	4 ± 0,55	12 ± 1,58	14 ± 0,84	73,8 ± 1,92
	Ch	1094 ± 129,7	62 ± 2,74	3 ± 0,55	13 ± 1,82	12 ± 1,52	75,8 ± 3,11
	Av	1188 ± 205,7	64 ± 2,24	4 ± 0	12 ± 1,14	12 ± 1,14	76 ± 2,24
	Média	1046 ± 381,9 ^a	63,5 ± 2,35 ^b	4 ± 0,44 ^b	12 ± 1,5 ^a	13 ± 1,54 ^a	75 ± 2,29 ^b

^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si ($P < 0,05$).

Tabela 2

Valores da média e desvio padrão das variáveis da cinética espermática para os grupos heterospermico e homospermicos e touros.

Grupo	Touro	MT (%)			MP (%)			VAP (µm/s)		
He	Bo/Ac	67,00	±	9,30 ^{a AB}	47,80	±	7,19 ^{a AB}	93,24	±	3,26 ^{a AB}
	Vo/Ch	65,60	±	12,34 ^{a AB}	50,00	±	8,69 ^{a AB}	80,16	±	3,65 ^{b B}
	Av/Ca	71,20	±	8,44 ^{a AB}	49,20	±	9,36 ^{a AB}	93,32	±	8,44 ^{a AB}
	Ke/As	56,40	±	9,58 ^{a AB}	39,40	±	8,20 ^{a AB}	83,78	±	8,04 ^{b AB}
Média		65,05	±	0,74 [*]	46,60	±	8,85 [*]	87,63	±	8,31 [*]
HoA	Vo	71,60	±	7,54 ^{a AB}	51,60	±	2,61 ^{a A}	83,72	±	9,91 ^{b AB}
	Bo	70,60	±	10,16 ^{a AB}	49,20	±	7,09 ^{a AB}	97,04	±	4,74 ^{a A}
	Ca	70,40	±	10,60 ^{a AB}	49,40	±	10,41 ^{a AB}	90,76	±	10,19 ^{ab AB}
	Ke	62,40	±	12,05 ^{a AB}	44,00	±	10,37 ^{a AB}	86,64	±	3,31 ^{b AB}
Média		68,75	±	10,11 [*]	48,55	±	8,10 [*]	89,54	±	8,71 [*]
HoM	Ac	65,00	±	16,70 ^{a AB}	49,00	±	12,10 ^{a AB}	87,32	±	7,85 ^{a AB}
	As	46,00	±	22,95 ^{b B}	31,00	±	13,87 ^{b B}	86,28	±	7,53 ^{a AB}
	Ch	72,00	±	6,82 ^{a AB}	53,60	±	3,44 ^{a A}	83,70	±	4,63 ^{a AB}
	Av	78,00	±	12,31 ^{a A}	52,40	±	10,31 ^{a A}	94,52	±	4,86 ^{a AB}
Média		65,25	±	19,07 [*]	46,50	±	13,55 [*]	87,96	±	7,17 [*]

^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, dentro do mesmo grupo, diferem entre si (P<0,05). ^{A,B} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si (P<0,05). * Médias, na coluna, não diferem significativamente entre si (P>0,05).

Tabela 3

Valores da média e desvio padrão das variáveis da cinética espermática para os grupos heterospérmico e homospérmicos e touros.

Grupo	Touro	VSL (μm/s)				VCL (μm/s)				ALH (μm)			
He	Bo/Ac	73,90	±	2,86	^a ^{AB}	153,68	±	6,06	^a ^{AB}	6,16	±	0,30	^a ^{AB}
	Vo/Ch	67,32	±	2,43	^{bc} ^B	124,44	±	9,20	^b ^B	4,90	±	0,41	^b ^C
	Av/Ca	72,10	±	3,96	^{ab} ^{AB}	155,80	±	20,09	^a ^{AB}	6,18	±	0,73	^a ^{AB}
	Ke/As	65,92	±	3,02	^c ^B	140,04	±	19,14	^{ab} ^{AB}	5,68	±	0,72	^a ^{ABC}
Média		69,81	±	4,42	[*]	143,49	±	18,80	[*]	5,73	±	0,75	[*]
HoA	Vo	67,38	±	5,47	^b ^B	133,16	±	21,30	^a ^{AB}	5,20	±	0,85	^b ^{BC}
	Bo	75,88	±	0,69	^a ^A	159,66	±	12,22	^a ^A	6,34	±	0,50	^a ^{AB}
	Ca	70,56	±	3,98	^b ^{AB}	147,94	±	23,28	^a ^{AB}	5,90	±	0,80	^{ab} ^{ABC}
	Ke	68,12	±	4,17	^b ^{AB}	142,20	±	8,87	^a ^{AB}	5,62	±	0,31	^b ^{ABC}
Média		70,49	±	5,01	[*]	145,74	±	18,83	[*]	5,77	±	0,74	[*]
HoM	Ac	70,32	±	5,77	^a ^{AB}	147,38	±	12,60	^{ab} ^{AB}	5,88	±	0,33	^{ab} ^{ABC}
	As	67,44	±	4,57	^a ^B	147,22	±	14,27	^{ab} ^{AB}	6,10	±	0,51	^a ^{ABC}
	Ch	69,32	±	3,79	^a ^{AB}	131,30	±	8,56	^b ^{AB}	5,24	±	0,34	^b ^{ABC}
	Av	72,16	±	3,02	^a ^{AB}	159,12	±	10,36	^a ^A	6,44	±	0,42	^a ^A
Média		69,81	±	4,41	[*]	146,26	±	14,74	[*]	5,92	±	0,58	[*]

^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, dentro do mesmo grupo, diferem entre si ($P < 0,05$). ^{A,B,C} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si ($P < 0,05$). * Médias, na coluna, não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$).

Tabela 4

Valores da média e desvio padrão das variáveis da cinética espermática para os grupos heterospérmico e homospérmicos e touros.

Grupo	Touro	BCF (Hz)		STR (%)		LIN (%)	
He	Bo/Ac	27,28	± 1,42 ^a AB	79,40	± 1,34 ^b AB	50,40	± 1,95 ^b AB
	Vo/Ch	31,50	± 2,44 ^a A	84,20	± 2,17 ^a A	57,20	± 3,27 ^a A
	Av/Ca	27,50	± 3,42 ^a AB	78,20	± 4,27 ^b AB	49,40	± 4,93 ^b AB
	Ke/As	28,64	± 2,94 ^a AB	80,20	± 4,21 ^{ab} AB	50,80	± 4,76 ^b AB
	Média	28,73	± 2,99 [*]	80,50	± 3,78 [*]	51,95	± 4,78 [*]
HoA	Vo	29,82	± 4,28 ^a AB	81,40	± 4,16 ^a AB	54,20	± 5,07 ^a AB
	Bo	25,78	± 3,53 ^a AB	78,20	± 3,90 ^a AB	50,00	± 3,81 ^a AB
	Ca	27,62	± 2,99 ^a AB	79,20	± 4,09 ^a AB	51,40	± 4,72 ^a AB
	Ke	28,88	± 2,54 ^a AB	80,00	± 4,36 ^a AB	51,20	± 3,90 ^a AB
	Média	28,03	± 3,48 [*]	79,70	± 3,97 [*]	51,70	± 4,34 [*]
HoM	Ac	29,32	± 1,22 ^a AB	81,60	± 1,52 ^a AB	51,00	± 1,41 ^{ab} AB
	As	25,40	± 1,81 ^b B	79,60	± 3,44 ^{ab} AB	49,20	± 3,19 ^b B
	Ch	30,66	± 1,90 ^a AB	82,80	± 2,49 ^a AB	55,40	± 2,70 ^a AB
	Av	25,80	± 2,06 ^b AB	76,80	± 1,64 ^b B	47,80	± 1,64 ^b B
	Média	27,80	± 2,82 [*]	80,20	± 3,21 [*]	50,85	± 3,65 [*]

^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, dentro do mesmo grupo, diferem entre si (P<0,05). ^{A,B} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si (P<0,05). * Médias, na coluna, não diferem significativamente entre si (P>0,05).

Tabela 5

Valores da média e desvio padrão da rapidez do espermatozóide e da integridade de membrana plasmática para os grupos heterospérmico e homospérmicos e touros.

Grupo	Touro	RAP (%)				IMP (%)			
He	Bo/Ac	64,40	±	8,85	^a ^{AB}	40,40	±	5,32	^a ^A
	Vo/Ch	61,20	±	11,88	^a ^{AB}	34,60	±	9,52	^a ^{AB}
	Av/Ca	68,60	±	8,82	^a ^{AB}	43,50	±	10,42	^a ^A
	Ke/As	52,80	±	8,93	^a ^{AB}	26,50	±	5,52	^a ^{AB}
	Média	61,75	±	10,71	[*]	36,25	±	9,92	[*]
HoA	Vo	67,60	±	7,16	^a ^{AB}	41,30	±	15,17	^a ^A
	Bo	68,60	±	10,16	^a ^{AB}	38,80	±	15,35	^a ^{AB}
	Ca	67,20	±	10,31	^a ^{AB}	32,00	±	8,86	^a ^{AB}
	Ke	58,60	±	11,17	^a ^{AB}	31,60	±	13,88	^a ^{AB}
	Média	65,50	±	9,91	[*]	35,93	±	13,19	[*]
HoM	Ac	62,40	±	17,13	^a ^{AB}	32,80	±	14,01	^{ab} ^{AB}
	As	43,20	±	22,14	^b ^{AB}	16,30	±	6,31	^c ^B
	Ch	68,00	±	6,96	^a ^{AB}	30,70	±	10,40	^b ^{AB}
	Av	74,60	±	12,22	^a ^{AB}	46,30	±	10,82	^a ^A
	Média	62,05	±	18,73	[*]	31,53	±	14,70	[*]

^{a,b,c} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, dentro do mesmo grupo, diferem entre si ($P<0,05$). ^{A,B} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si ($P<0,05$). * Médias, na coluna, não diferem significativamente entre si ($P>0,05$).

Tabela 6

Coeficiente de correlação entre as variáveis da análise computadorizada do sêmen

Variáveis		Coeficiente de correlação ⁽¹⁾
		Experimento
IMP (%)	MT(%)	0,707
MP (%)	IMP (%)	0,660
MP (%)	MT(%)	0,928
MT(%)	IMP (%)	0,711
RAP (%)	MT(%)	0,997
VAP (um/s)	VSL (um/s)	0,838
VAP (um/s)	VCL (um/s)	0,962
VAP (um/s)	ALH (um)	0,902
VSL (um/s)	VCL (um/s)	0,701
VSL (um/s)	ALH (um)	0,609
VCL (um/s)	ALH (um)	0,975
BCF (Hz)	VAP (um/s)	-0,663
BCF (Hz)	VCL (um/s)	-0,778
BCF (Hz)	VSL (um/s)	-0,254 ^{ns}
STR (%)	VAP (um/s)	-0,766
STR (%)	VCL (um/s)	-0,846
STR (%)	VSL (um/s)	-0,309*
LIN (%)	VAP (um/s)	-0,731
LIN (%)	VCL (um/s)	-0,869
LIN (%)	VSL (um/s)	-0,288*
RAP (%)	MP (%)	0,920
RAP (%)	VSL (um/s)	0,327*
BCF (Hz)	LIN (%)	0,907
STR (%)	LIN (%)	0,946

⁽¹⁾ P < 0,0001^{ns} P > 0,05

*P < 0,05

Tabela 7
Influência do sêmen homospérmico e heterospérmico sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Grupo	n oócitos	Desenvolvimento embrionário – n (%)		
		Fertilizados 72 h*	Mo/Bl 144 h	Bl/Bx/Be 168 h
HoA	129	109 (84,52) ^a	49 (38,00) ^b	41 (31,82) ^b
HoM	120	108 (90,03) ^a	63 (52,54) ^{ab}	57 (47,54) ^a
He	120	107 (89,20) ^a	64 (53,31) ^a	51 (42,53) ^{ab}

^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, diferem significativamente entre si (P<0,05).

*Desenvolvimento temporal – hpi.

Dados de 6 repetições foram agrupados.

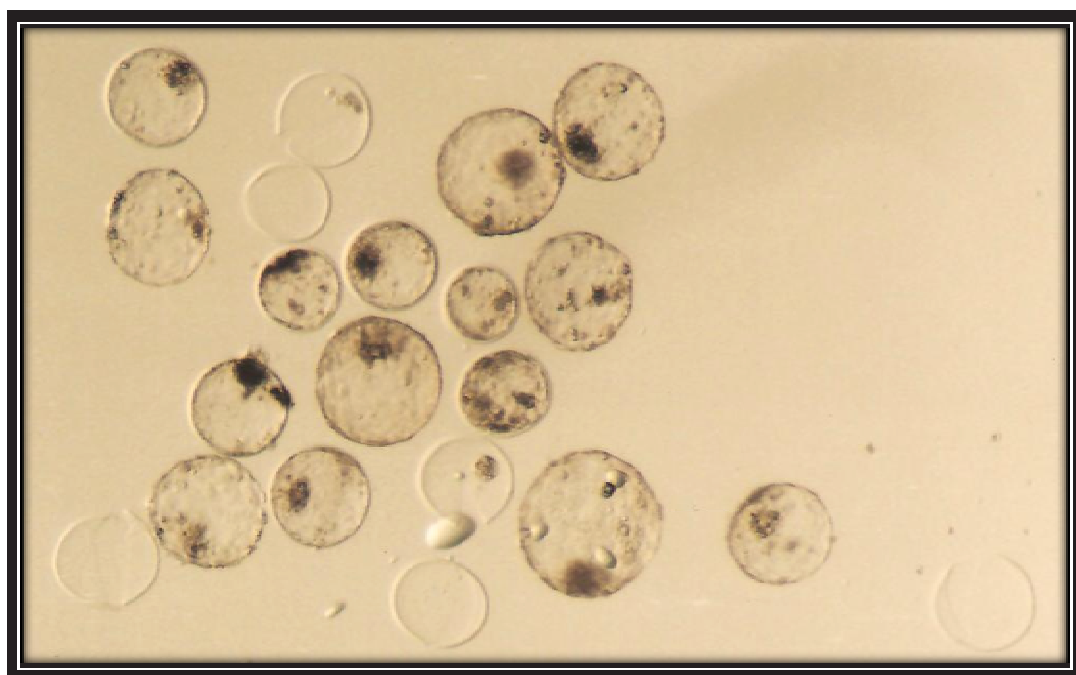


Fig. 1. Embriões do grupo heterospérmico, aos estágios de Bl, Bx e Bec, às 192 hpi (40x).

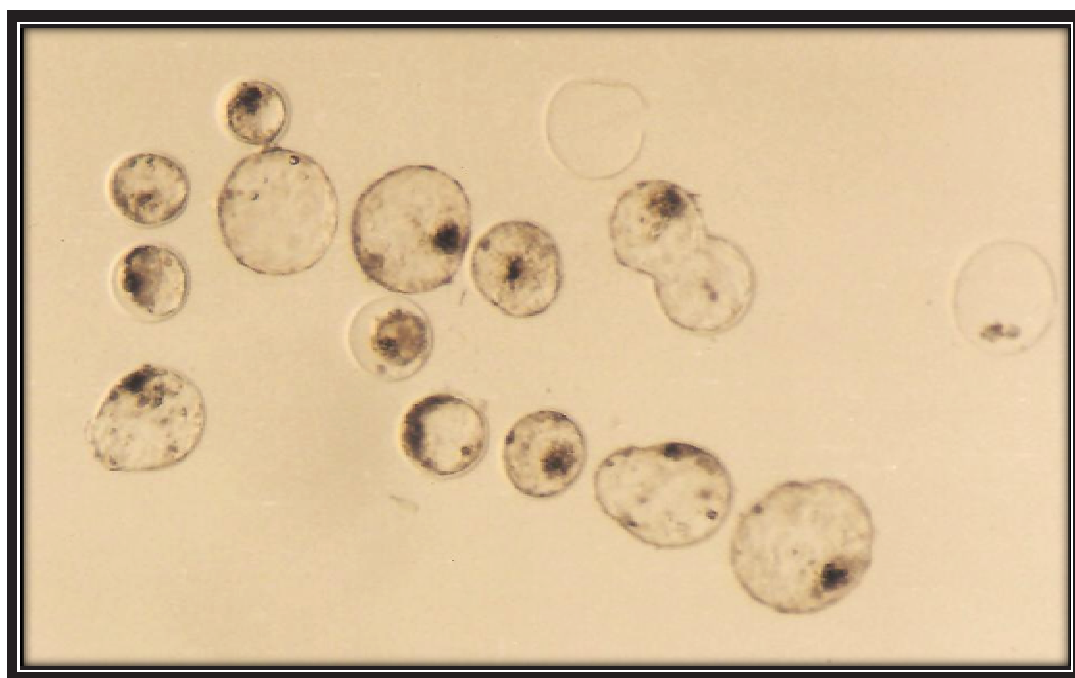


Fig. 2. Embriões do grupo homospERMico (HoA), aos estágios de Bl, Bx, Be e Bec, às 192 hpi (40x).

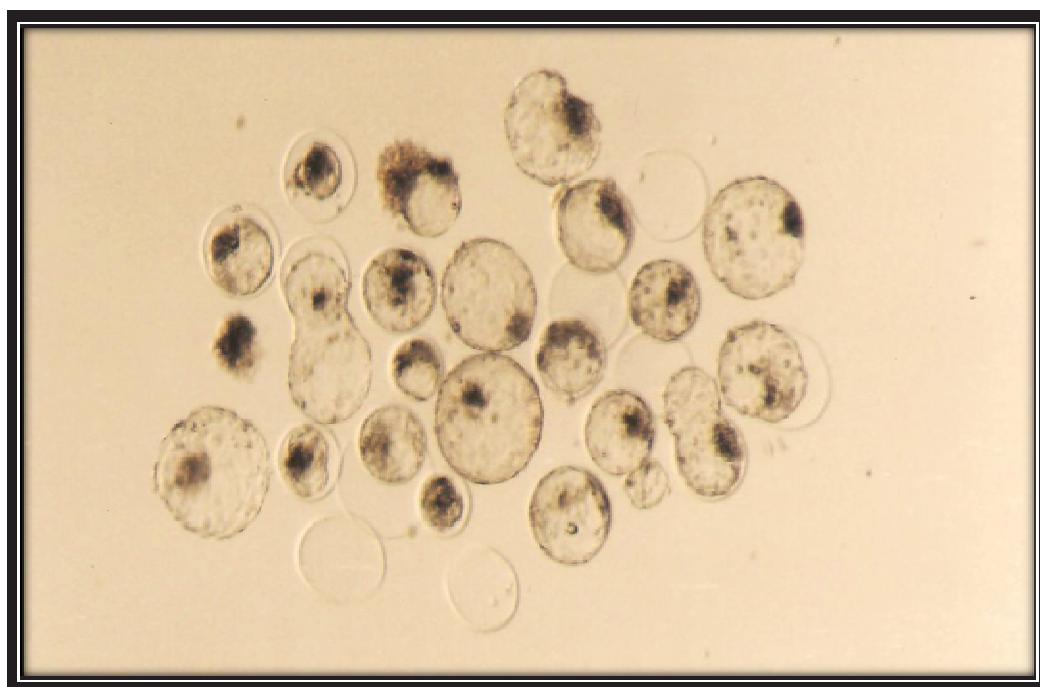


Fig. 3. Embriões do grupo homospérmico (HoM), aos estágios de Bl, Bx, Be e Bec, às 192 hpi (40x).

***Trabalho científico número 2 a ser enviado à revista Theriogenology
(Apêndice.1)***

**Avaliação do sêmen heterólogo e homólogo, produção de embriões *in vitro* e
concentração de testosterona plasmática em touros da raça Nelore
portadores de sêmen de alta e média congelabilidade**

R.S. Calegari^a, A. Martins Jr.^{b*}, D.G. Souza^a, A.A. Ramos^c, S. Perri^b, E.Oba^a

^a Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Universidade
Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

^b Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal – Universidade Estadual
Paulista, Araçatuba, SP, Brasil.

^c Departamento de Produção Animal – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP,
Brasil.

*Autor para correspondência.

Prof. Dr. Alicio Martins Júnior

Endereço: Rua Clóvis Pestana, 793, CEP: 16050-680, Araçatuba/SP, Brasil.

Universidade Estadual Paulista, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução
Animal, UNESP, Câmpus de Araçatuba.

Tel: + 55(18) 3636-1410

e-mail: amartins@fmva.unesp.br

Resumo

Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a eficácia da substituição do plasma seminal (PS) de touros classificados com sêmen de média congelabilidade (grupo homospérmico, HoM) por PS heterólogo de touros classificados com sêmen de alta congelabilidade (grupo homospérmico, HoA), avaliada através do movimento espermático (ME), integridade da membrana plasmática (IMP), proteína total (PT) e padrão eletroforético das proteínas do plasma seminal (PE). A produção *in vitro* de embriões (PIV) e a concentração plasmática de testosterona (TP), também, foram investigadas para ambos os grupos HoA e HoM. O plasma seminal heterólogo (PSH) foi caracterizado pela mistura de PS de touros HoA com espermatozoides de touros HoM. Amostras de sêmen de oito touros da raça Nelore foram obtidas através de vagina artificial. Procedimentos usuais de congelação e descongelação foram empregados. A ME e a IMP foram avaliadas, através de análise espermática computadorizada e corantes fluorescentes, respectivamente; PT e TP foram testados utilizando-se “kit” comercial. A eletroforese do PS foi realizada através de SDS-PAGE (10%). Os critérios para observação da PIV foram as porcentagens de oócitos fertilizados atingindo M/B e B/Bx/Be as 72, 144 e 168 h pós-inseminação (hpi). Nenhuma diferença significativa foi observada para ME, PT, TP entre os grupos, porém, maior número de membranas plasmáticas intactas ($P<0,05$) foi encontrado no grupo HoA. Maior taxa de clivagem ($P<0,05$) foi obtida no grupo PSH (92,31%) do que no HoA (80,15%) e HoM (77,34%), contudo, as porcentagens de embriões as 144 e 168 hpi não diferiram entre todos os grupos. Sete padrões de proteínas (A, B, C, D, E, F e G) foram detectados no PS, com o número de frações protéicas variando de 20 a 25, sendo classificadas de acordo com a intensidade de coloração. Quando o PE foi comparado ao ME e IMP, melhores resultados para as variáveis espermáticas foram obtidos para o PE classificado como A

do que para os demais. Por outro lado, maior concentração de PT e TP foi observado para PE tipo D (50,64 mg/mL) e E (1109,41 ng/mL), respectivamente. Concluindo, foi demonstrado um efeito benéfico do PSH sobre as taxas de clivagem, mas, sem diferença para os demais parâmetros espermáticos utilizados neste experimento, com exceção à IMP. Além disso, o padrão eletroforético das proteínas plasmáticas seminais, testosterona e concentração de proteína total variaram entre touros. Assim, teste de campo deve ser realizado, a fim de melhor compreender esses achados. Este estudo teve apoiado parcial da Central de inseminação artificial VR, Araçatuba, SP, Brasil.

Palavras-chave: sêmen homospérmico; plasma seminal; sêmen heterospérmico; análises espermáticas, produção *in vitro* de embrião.

Abstract

This study was carried out to determine the effectiveness of the replacement of seminal plasma (SP) of bulls with medium semen freezability (homospermic group, MH) by heterologous SP of bulls with high semen freezability (homospermic group, HH), as evaluated by their sperm motion (SM), plasma membrane integrity (PMI), total protein (TP), and electrophoretic profile of plasma seminal protein (EP). In vitro embryo production (IVP) and plasma testosterone level (PT) were also investigated for both HH and IH groups. The heterologous seminal plasma (HSP) group was characterized by a mixture of SP of bull HH with spermatozoa pellet of bull IH. Seminal samples collected by artificial vagina from 8 Nellore bulls were used. Usual freezing and thawing procedures were employed. SM and PMI were assessed by computer- assisted sperm analyzer and fluorescent dyes, respectively; TP and PT were tested using commercial kits. Electrophoresis was performed by SDS-PAGE (10%). Endpoints for IVP were

percentages of fertilized oocytes reaching M/B and B/EB/HB stages at 72, 144, and 168 h post-insemination (hpi). No significant difference was observed for SM, TP, and PT among groups, but more intact plasma membranes ($P<0.05$) were found in group HH. Higher cleavage rate ($P<0.05$) was obtained in group HSP (92.31%) than for HH (80.15%) and MH (77.34%), however, percentages of embryos yielded at 144 and 168 h pi did not differ among all groups. Seven protein profiles (referred as A, B, C, D, E, F, and G) were detected in SP, with number of protein fractions ranging from 20 to 25, which were classified by different staining intensities displayed. When the EP was compared to SM and PMI, better results for sperm variables were obtained for EP classified as A than for the others. On the other hand, higher level of TP and PT were observed for EP D (50.64 mg/ml) and E (1109.41 ng/ml), respectively. In conclusion, the results showed a beneficial effect of HSP on cleavage rates, but not for all others sperm tests used in this experiment, exception for plasma membrane integrity. Moreover, the electrophoretic profile of plasma seminal protein varied among bulls and influenced testosterone and total protein level. Thus, a field trial should be performed in order to better understand these findings. This study was supported in part by VR Insemination Station, Araçatuba, SP, Brazil.

Keywords: homospermic, heterospermic, seminal plasma, sperm analysis, in vitro embryo production

1. Introdução

A pecuária tem uma grande importância econômica no Brasil, principalmente a de corte, visto que o país é o segundo maior produtor e o maior exportador de carne bovina do mundo [1]. Para manutenção dessa condição, há necessidade de um constante aumento da produtividade do rebanho.

A utilização de sêmen congelado se reveste de grande importância, pois difunde rapidamente os genótipos desejáveis na população e, sendo assim, a fertilidade do touro tem um grande impacto sobre o desempenho do rebanho [2]. Tentativas para se incrementar a eficiência do sêmen congelado têm sido feitas, principalmente, através da investigação de diferentes meios e protocolos de congelação [3-5] e, raramente, mediante uso de sêmen heterospérmico [6,7].

No touro, o plasma seminal (PS) representa de 50 a 90% do ejaculado e seu conteúdo em proteínas, ao redor de 10%, influencia a fertilidade, já que a composição protéica varia entre animais férteis e inférteis [8-10].

A variação individual na composição do PS exerce um papel significativo sobre a motilidade espermática, pós-descongelação, em diferentes ganhões [11]. Esses autores observaram que a adição de PS de ganhões portadores de sêmen de boa motilidade ao sêmen de ganhões com baixa motilidade, incrementou a motilidade espermática, pós-descongelação.

A sobrevivência das células espermáticas pode ser aumentada, particularmente, em ganhões identificados como “bad coolers”, através da remoção do PS antes da re-suspensão dos espermatozóides no meio diluente [12]. Em carneiros, a remoção do plasma seminal também foi benéfica para a motilidade, linearidade e capacitação [13] e congelabilidade [14].

Os relatos sobre a centrifugação do sêmen bovino, antes da congelação, são escassos. Rota et al. [15] descreveram efeitos prejudiciais do PS sobre a membrana plasmática dos espermatozóides, porém, [16] observaram que a remoção parcial do PS de amostras de touros com baixa concentração espermática (500×10^6) incrementou em mais de 40% a viabilidade de se congelar essas amostras com êxito. Tanajura et al. [5] observaram efeitos benéficos da centrifugação do sêmen de touros, antes da congelação, em comparação com o grupo não centrifugado.

Experimentos com a utilização de plasma seminal heterólogo (PSH) são muito limitados. Henault e Killian [17] investigando os efeitos do PS homólogo e heterólogo sobre a habilidade fertilizante de espermatozóides de touro observaram que espermatozóides de ejaculados de touros de baixa fertilidade foram discretamente melhorados pela adição de PS de touros de alta fertilidade, enquanto que a fertilidade foi deprimida quando os espermatozóides foram expostos ao PS de touros de baixa fertilidade.

Similarmente, a adição de PS de garanhões portadores de sêmen de alta motilidade, pós-descongelção, ao sêmen de garanhões com sêmen de baixa motilidade foi benéfica, melhorando a motilidade deste grupo de animais [11].

No entanto, além de se buscar alternativas para melhor a eficiência do sêmen congelado, investigações sobre a testosterona plasmática e das proteínas do PS podem fornecer subsídios para prever a fertilidade do sêmen. Contudo, pesquisas nesse sentido não têm merecido tanta atenção.

Katongole et al. [18] constataram variações nas concentrações de testosterona plasmática (2 a 20 ng/mL), em touros *Bos taurus taurus*, sendo que estas foram coincidentes com os picos de LH. [19] e [20] relataram, em touros, a presença de três picos de testosterona, em média.

Correlações significativas têm sido demonstradas entre a concentração sanguínea de testosterona com a fertilidade e a motilidade espermática. Post e Christensen [21], trabalhando com touros mestiços, verificaram maiores concentrações de testosterona naqueles animais com maiores taxas de fertilidade, verificadas através do número de vacas gestantes. Andersson [22] relatou correlação positiva entre a concentração de testosterona sérica e a fertilidade de touros, constatada através da taxa de não retorno ao cio. Constatou, também, que os animais com sêmen de maior motilidade apresentaram, em média, maior concentração de testosterona.

Barbosa [20], trabalhando com touros das raças Canchim e Nelore, obteve correlações entre a concentração plasmática de testosterona com o ejaculado (volume x concentração) e a circunferência escrotal, em touros da raça Canchim, aos 39 meses de idade, além da capacidade de serviço, em touros da raça Nelore, aos 27 meses de idade. As concentrações de testosterona foram maiores nos touros da raça Nelore (3,1 e 4,1 ng/mL) em comparação com os touros da raça Canchim (1,2 e 2,1 ng/mL), aos 27 e 39 meses de idade, respectivamente.

Entretanto, estudos avaliando as características do PS e sua relação com a fertilidade são limitados. Parte da variação na fertilidade observada entre touros é devido aos fatores não aparentes em avaliações seminais de rotina [23]. O padrão eletroforético das proteínas do PS bovino tem sido investigado com o objetivo de se caracterizar possíveis marcadores bioquímicos para a fertilidade [24-26] e viabilidade do sêmen [11]. O padrão eletroforético (PE) das proteínas do PS bovino apresenta marcada variação quanto ao número de bandas e intensidade de coloração das mesmas [27,28,24,25,29].

Roncolletta et al. [26], estudando as proteínas do PS, em touros da raça Gir, identificaram elevada concentração de uma proteína (61,8 kDa) no sêmen de alta

congelabilidade. Estudos de [30] indicaram que as principais frações protéicas (50-70% ou 30-50 mg/mL) do PS bovino eram representadas por uma família de proteínas relacionadas, designadas como BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 a BSP-30 kDa.

A presença, ausência ou crítica concentração de proteínas no PS pode potencialmente ser responsável pelos efeitos do PS sobre a fertilidade do sêmen [17]. Ao contrário do plasma sanguíneo bovino, o conteúdo protéico do PS apresenta considerável variação [28,31,24], consistindo, principalmente, de globulinas [32, 27].

Devido à escassez de publicações sobre os referidos temas, este trabalho teve por objetivos: 1- comparar o sêmen homospérmico (a partir de amostras de alta e média congelabilidade) com o “pellet” de espermatozóides reconstituído com PSH, através da avaliação dos parâmetros espermáticos, mediante análise computadorizada (CASA) e de integridade de membrana plasmática (IMP); 2- verificar e comparar a concentração plasmática de testosterona e de proteína total do PS de touros portadores de sêmen de alta e média congelabilidade; 3- determinar o PE das proteínas do PS de touros com sêmen de alta e média congelabilidade, da raça Nelore, comparando-os com os resultados dos parâmetros espermáticos (CASA e IMP) e de concentração da PT e da testosterona plasmática.

2. Material e Método

2.1. Experimento 1

2.1.1. Animais e colheita do sêmen

Amostras de sêmen de oito touros da raça Nelore foram obtidas de animais lotados em Central de Inseminação Artificial. Os reprodutores foram selecionados, com base nos dados de congelabilidade do sêmen, a partir do histórico de motilidade (M) e vigor (V), bem como dos resultados de análises pré-congelação.

Desta forma, os touros foram classificados como portadores de sêmen de alta ($M \geq 50\%$; $V \geq 3$) e de média ($M = 40-45\%$; $V = 3$) congelabilidade, e apenas amostras com no mínimo 60% de motilidade, vigor ≥ 3 e células normais $\geq 70\%$ (máximo 30% de defeitos totais e 15% de maiores) foram utilizadas para os procedimentos de congelação (Tabela 1).

Quatro touros portadores de sêmen de alta congelabilidade (Vo, Ke, Bo e Ca,) e quatro de média congelabilidade (Po, Ma, Ch, Av), formaram, respectivamente, os grupos homospérmicos (HoA e HoM) e o grupo com plasma seminal heterólogo (PSH); este último, através da combinação do plasma seminal (PS) do grupo HoA com o “pellet” de espermatozóides do grupo HoM (Bo/Po, Ca/Av, Vo/Ch, Ke/Ma).

Um total de cinco ejaculados de cada touro foi colhido através de vagina artificial e 25 doses de cada colheita e de cada reprodutor foram congeladas e armazenadas, para posterior análise dos parâmetros espermáticos e produção *in vitro* de embriões.

2.1.2. Avaliação espermática pré-congelação

As amostras de sêmen foram pesadas (balança, Marte, AL 200-C, Brasil) para cálculo do volume do ejaculado, segundo metodologia descrita por [33]. A seguir, a motilidade e o vigor espermático foram estimados em microscópio de contraste de fase (Carl Zeiss®, Alemanha), ao aumento de 200 x. A concentração espermática foi obtida

através de espectrofotometria (Accucell[®], IMV, França) e a morfologia através de microscopia de contraste de fase (Olympus[®], Japão), sob aumento de 1.000 x.

2.1.3. Centrifugação do sêmen

Cada ejaculado foi dividido em duas alíquotas, diluído no meio de congelação (MC, TRIS-frutose-ácido cítrico, com 20% de gema; fração A), na proporção de 1:2, e centrifugado a 700 g/10 min. (Centrífuga Eppendorf[®], Alemanha), à temperatura ambiente, para remoção do PS. Desta forma, o PS do grupo HoA re-suspendeu o “pellet” de espermatozóides do grupo HoM. Amostras de PS de ambos os grupos foram processadas e armazenadas para posterior verificação da concentração de proteína total (PT) e análise do padrão eletroforético (PE) das proteínas.

2.1.4. Diluição, resfriamento e congelação

As amostras foram pré-diluídas (10 mL de diluente) com a fração A (35 °C) e colocadas para refrigeração em balcão a 5 °C. Ao atingir 5 °C, o restante da fração A foi adicionado, seguido do volume total da fração B (MC acrescido de 7% de glicerol; a 5 °C), permanecendo por mais 4 horas, antes da congelação. A concentração espermática final foi ajustada para 60×10^6 espermatozóides/mL, correspondendo a 30×10^6 /palheta.

Após o período de equilíbrio, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL (IMV[®], França) e congeladas em congelador programável (Digitcool[®], IMV, França), seguindo a seguinte curva de congelação: de 4 °C a -10 °C (5 °C/min.), de -10 °C a -100 °C (40°C/min.) e de -100°C a -140°C, a 20°C/min., por oito minutos. A seguir, as palhetas

foram mergulhadas em nitrogênio líquido, raqueadas e armazenadas em botijão isotérmico até o momento das análises.

2.1.5. Análises espermáticas e procedimentos pós-descongelção

2.1.5.1 Motilidade e movimento espermático

As amostras de sêmen foram submetidas à análise computadorizada (Hamilton Thorne Research[®], Ivos-10, EUA). Após descongelção, em banho-maria a 46 °C por 20 s, as amostras foram colocadas em câmara de Makler, pré-aquecida (37 °C), sendo observados cinco campos aleatórios e no mínimo 150 espermatozóides por campo. Os seguintes parâmetros de foram avaliados: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), linearidade (LIN, %), progressividade (STR, %) e rapidez (RAP, %).

2.1.5.2. Integridade de membrana plasmática

As amostras seminais foram avaliadas, quanto a IMP, através do emprego de sondas fluorescentes, diacetato de 6-carboxi-fluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI), conforme metodologia descrita por [34]. Resumidamente, a solução corante de CFDA (0,8 μL) e PI (5 μL) foi adicionada ao sêmen e incubada a 37 °C, por 15 minutos, sendo, a seguir, colocado em solução de glutaraldeído (0,2%); uma amostra de 4-5 μL

foi colocada sobre lâmina/lâminula, aquecidas, e examinadas em microscópio de fluorescência, ao aumento de 1000 x.

2.1.5.3. Produção de embriões *in vitro*

Ovários de vacas abatidas em frigorífico foram transportados em garrafa térmica contendo solução fisiológica, à temperatura de 31 a 33 °C. Folículos de 2-7 mm de diâmetro foram aspirados, sendo os oócitos lavados e selecionados em meio de maturação base (MM-b), constituído de Meio 199, acrescido de 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 0,05 mg/mL de piruvato de sódio, 0,05 mg/mL de sulfato de gentamicina e 1 mg/mL de álcool polivinílico (PVA). Somente oócitos com citoplasma homogêneo e pelo menos 3-4 camadas de células do *cumulus* foram utilizados.

A seguir, 15 a 20 oócitos foram distribuídos, aleatoriamente para gotas (100 µL) de MM-b, sem PVA, mas com a adição de 1 µg/mL de FSH (Pluset[®], Serono), 5 µg/mL de LH (Lutropin[®], Bionche) e 10% de soro fetal bovino (SFB[®], Nutricell), em estufa a 5% de CO₂, a 38,5 °C, por de 24 horas.

Para a realização da FIV, uma dose de sêmen foi descongelada a 37 °C por 30 s e centrifugada em gradiente Percoll (45% e 90%; Nutricell[®], Campinas, Brasil) a 700 g, durante 20 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido, os espermatozóides re-suspensos em 3 mL de meio TALP e centrifugados (250 g), por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” diluído em 50 µL de meio FIV (TALP + PHE + heparina). Posteriormente, foi realizada a contagem espermática em câmara de Neubauer (5 µL da suspensão de espermatozóides em 95 µL de solução formol-salina), bem como avaliada a motilidade e o vigor.

Grupos de 20 oócitos foram coincubados com espermatozóides (concentração final de $1,0 \times 10^6/\text{mL}$ x motilidade), em gotas de meio FIV, sob óleo mineral, em atmosfera úmida a 5% de CO_2 , em ar, a $38,5^\circ\text{C}$, por 20 h.

Ao término da etapa de inseminação, as células do *cumulus* foram removidas parcialmente, através de sucessivas pipetagens e os prováveis zigotos, em grupos de 20, transferidos para gotas (100 μL) de meio de cultura SOF-m (modificado). Decorridas 72 horas pós-inseminação (hpi), a clivagem foi verificada e 50% do meio de cultura foi substituído por meio fresco, sendo o procedimento repetido novamente às 120 hpi. A etapa de cultura foi realizada sob as mesmas condições descritas para MIV e FIV.

O desenvolvimento embrionário foi monitorado para verificar os oócitos maturados que fertilizaram e alcançaram os estágios de mórula/blastocisto (Mo/Bl) e blastocisto/blastocisto expandido/blastocisto em eclosão (Bl/Bx/Be) às 72, 144 e 168 hpi, respectivamente.

2.2 *Experimento 2*

2.2.1. *Eletroforese de proteínas do PS*

Para obtenção do PS, o sêmen foi diluído com meio TRIS-frutose-ácido cítrico (1:2) e centrifugado a $2.500 \times g$, por 15 min., seguido da remoção do sobrenadante (PS), o qual foi submetido à centrifugação ($2.500 g$, por 15 min.), após diluição em solução de clorofórmio a 98% (1:2), visando a remoção total dos espermatozóides e outras células, de acordo com protocolo descrito por [24]. As amostras de PS foram, então, estocadas em freezer a -20°C , até o momento do uso.

A separação das proteínas do PS foi realizada, segundo protocolo relatado por Laemmli (1970), em gel de poliacrilamida e duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em gel de separação (10%) e empilhamento (5%). A concentração de proteína de cada amostra foi ajustada para 80 µg e, a seguir, diluída em tampão da amostra, constituído de Tris-HCL (1M), 2% de SDS, 5% de 2-mercaptoetanol e 50% glicerol.

Antes da aplicação da amostra no gel (25µL/poço), a mistura foi aquecida a 100 °C, por 3 min. A voltagem adotada no gel de separação e de empilhamento foi de 110 V e 40 V, respectivamente. Juntamente com as mostras, em poço separado, foi aplicado um padrão com diferentes pesos moleculares (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas Life Sciences - USA) para facilitar a identificação do peso molecular das bandas formadas.

Após o término da corrida (12 h), o gel foi colocado em solução descorante por 5 min., sob constante agitação, seguida de solução corante Comassie-Blue, por 15 min., em contínua agitação. Decorrido esse tempo, o gel passou por sucessivos banhos em solução descorante, trocada a cada 8-12 horas, até visualização nítida das bandas.

Para a documentação fotográfica, o gel foi colocado sob transluminador de luz branca (Vilber Lourmat®), sendo a imagem capturada através de máquina fotográfica (Canon® Powershot A640) e processada utilizando programa de imagem (ImageQuant 150 – GE Healthcare®).

2.2.2. Dosagem de proteína total do PS

A dosagem da proteína total do PS foi realizada através do método colorimétrico do ácido bicinonínico, com utilização de kit comercial (Pierce, EUA). Um total de 10 µL de cada amostra foi utilizado. Para cada poço, contendo as amostras e o padrão,

foram adicionados 200 µL da solução de trabalho (A, 50 partes e B, uma parte) sendo, então, incubadas a 37 °C, por 30 min. A curva padrão foi realizada com albumina, diluída conforme orientação do fabricante, nas concentrações de 200, 400, 600, 800 e 1000 µL/mL. A leitura da microplaca foi realizada no leitor de ELISA, em filtro de 540 nm.

2.2.3. Dosagem de testosterona plasmática sanguíneo

Foi realizada através do “kit” de dosagem de testosterona total, fase sólida, conforme instrução do fabricante (DPC-Diagnostic Products Co[®], USA), com leitura (ng/dL) no Gamma Count Cobra II.

2.3. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa SAS (SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.2.). Os dados das análises espermáticas foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias, com as respectivas médias comparadas pelo teste de Tukey. Os resultados de PIV foram analisados através de ANOVA, para verificar diferenças estatísticas, e do teste *t* de Bonferroni, para determinar diferenças entre os grupos de tratamento. Diferenças de $P < 0,05$ foram consideradas como significativas. O coeficiente da correlação de Pearson foi utilizado para verificar correlações entre as variáveis espermáticas analisadas pela técnica CASA. Análise de correlação linear de Pearson foi utilizada para verificar correlação entre as variáveis estudadas.

3. Resultados

A comparação entre o sêmen homospérmico de alta (HoA) e média (HoM) congelabilidade com o sêmen reconstituído (PSH), ou seja, PS de amostras de alta congelabilidade adicionadas ao “pellet” de espermatozóides de sêmen de média congelabilidade, foi realizada através da avaliação de alguns parâmetros espermáticos disponíveis na técnica CASA e, ainda, mediante análise da IMP dos espermatozóides (Tabelas 2, 3, 4 e 5).

De todas as variáveis estudadas, diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas para a variável STR, com valor inferior ao obtido para o grupo HoM (76,90%), em comparação com os grupos HoA (79,25%) e PSH (79,75), bem como para a variável IMP, a qual apresentou valores mais elevados no grupo HoA (40,65%) do que nos demais grupos.

Nos grupos PSH e HoM, todas as variáveis espermáticas apresentaram valores da média diferentes, entre os touros dentro de cada grupo, em comparação com o grupo HoA, o qual apresentou variações apenas para os parâmetros VAP, VSL, VCL, ALH e BCF.

No grupo PSH, os valores mais baixos dos parâmetros espermáticos foram obtidos principalmente para a associação de touros Vo/Ch (VAP, VSL, VCL e ALH), seguido pelos touros Ke/Ma (BCF, STR e LIN) e Bo/Po (MT, MP e RAP). Entretanto, para o grupo HoM, os touros Ch (MT, VAP, VSL e VCL) e Po (MT, RAP e IMP) apresentaram os menores valores, seguido pelo touro Vo (VAP, VSL, VCL e ALH) no grupo HoA.

Maiores valores da média, para as variáveis MT, VAP, VSL, VCL, ALH, RAP e IMP foram obtidos nos grupos PSH (touros Ke/Ma) e HoM (touro Ma), em relação ao grupo HoA, o qual apresentou maiores valores para as variáveis VAP, VSL e VCL, para o touro Bo.

Comparando-se todos os touros, independentemente do grupo, valores mais baixos foram observados para os touros Bo/Po e Vo/Ch, assim como valores da média mais elevados para os touros Ma e Ke/Ma.

O desenvolvimento embrionário, a partir do número de oócitos colocados para a maturação *in vitro*, está representado na Tabela 7. Maior porcentagem ($P<0,05$) de oócitos fertilizados foi obtida no grupo PSH (92,31%) do que nos grupos HoA (80,15%) e HoM (77,34%), com resultados similares entre estes dois grupos. Contudo, para os demais estágios de desenvolvimento, avaliados as 144 e 168 h pi, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos, com médias variando de 43,75 a 50,77% e de 34,35 a 40,00%, respectivamente, para os estágios de Mo/Bl e Bl/bx/Be.

Os resultados da concentração de testosterona plasmática e de proteína total do PS são mostrados na Tabela 8. Nenhuma diferença significativa foi constatada entre as médias dos grupos HoA ($639,64\pm 277,66$ ng/dL) e HoM ($729,31\pm 410,17$ ng/dL), contudo, maior concentração de testosterona ($P<0,05$) foi observada para os touros Vo e Ca ($833,81\pm 225,46$ e $856,34\pm 246,90$ ng/dL, respectivamente) no grupo HoA e para o touro Av no grupo HoM ($1109,41\pm 326,70$ ng/dL), sendo que neste grupo a mais baixa concentração foi obtida para o touro Po ($235,29\pm 152,58$ ng/dL). Considerando-se, todos os touros, tanto a maior concentração (touro Av) quanto a menor (touro Po) foram obtidas no grupo HoM.

Houve diferença significativa entre as médias de proteína total para os grupos HoA ($41,67\pm 9,45$ mg/mL) e HoM ($32,93\pm 10,33$ mg/mL). Entretanto, maiores valores para a

concentração de PT foram obtidos para os touros Vo e Ke (grupo HoA) e Po e Ma (grupo HoM), com a menor e maior média, entre todos os touros, respectivamente para os reprodutores Ch e Ke.

Os sete padrões eletroforéticos de proteínas do plasma seminal, obtidos após separação em gel de poliacrilamida a 10%, foram classificados conforme o número de bandas (A=21, B=25, C=22, D=22, E= 23, F=25 e G=20) e da distribuição dentro de três zonas principais (I, II e III). Para a zona I (95 a 260 kDa) foram observadas de 4 a 7 bandas, enquanto que para as zonas II (>26 até 72 kDa) e III (<17 até 26 kDa), respectivamente, de 7 a 8 e de 8 a 10 bandas foram determinadas.

Um maior número de bandas foi detectado na zona III, a qual, também, revelou a presença de bandas mais difusas e intensamente coradas, correspondendo às frações com maior mobilidade eletroforética. Por outro lado, a zona I apresentou um menor número de bandas, sendo mais estreitas e fracamente coradas. Os padrões eletroforéticos A, B, C, D, E, F e G corresponderam, respectivamente, aos touros Ma-Bo, Ch, Po, Ca, Av, Ke e Vo.

Os dados dos parâmetros espermáticos e dos padrões eletroforéticos do PS acham-se descritos na Tabela 8. De modo geral, touros com PE classificado como de padrão A (Ma-Bo) apresentaram melhores resultados para seis das 11 das variáveis espermáticas avaliadas (MT, MP, VAP, VCL, RAP e IMP), sendo seguido pelos de padrão D (4, MT, MP, RAP e IMP; touro Ca), B (3, BCF, STR e LIN; touro Ch), F (3, MT, RAP e IMP; touro Ke) e G (2, RAP e IMP; touro Vo). Assim, mais touros portadores de sêmen de alta congelabilidade (A, D, F e G) foram identificados como tendo sêmen de melhor qualidade, após análise computadorizada e de IM, do que os de média congelabilidade.

Entretanto, quando se compararam os resultados da concentração de proteína total e de testosterona com os PE, os maiores valores da média foram observados somente para touros com sêmen de alta congelabilidade, respectivamente, para os padrões D (touro Ca, 50,64 mg/mL) e E (touros Ca, $856,34 \pm 276,06^a$ e Av, $1109,41 \pm 326,70^a$).

4. Discussão

A avaliação do potencial de fertilidade do sêmen é muito importante antes da utilização em programas de inseminação artificial ou produção *in vitro* de embriões, como forma de se obter bons resultados [35] e para a identificação de amostras de sêmen de alta fertilidade [36]. A técnica CASA tem sido largamente empregada com esse propósito. No presente estudo, através desse método de avaliação, diferença significativa ($P < 0,05$) entre as médias e os grupos foi observada somente para a variável STR, com um valor inferior para o grupo HoM, evidenciando homogeneidade dos resultados.

Contudo, caracterizando a individualidade entre os touros, diferentes valores da média ocorreram entre os touros dentro de cada grupo, bem como entre todos os touros, para a maioria dos parâmetros espermáticos avaliados. Esses achados estão em concordância com o relato de [37], os quais verificaram grande variabilidade em todas as variáveis relacionadas com motilidade e velocidade espermática. Essa variabilidade pode ser decorrente da grande variação observada na composição do PS, levando, por sua vez, a resultados inconsistentes [38], embora, de acordo com [39], o PS seja um fluído desnecessário.

Os relatos sobre a utilização de PSH, em bovinos, são bastante limitados, principalmente com relação às avaliações espermáticas através da técnica CASA, tornando a análise comparativa difícil. Assim, a centrifugação do sêmen bovino, com remoção total ou parcial do PS, tem sido preconizada, ainda que raramente utilizada nessa espécie. Tanajura et al. [5] observaram efeitos benéficos da centrifugação e remoção total do PS do sêmen de touros, antes da congelação, sobre as variáveis MP, VSL, VAP, VCL e RAP, em comparação com o grupo não centrifugado. Da mesma forma, a remoção parcial do PS, após a centrifugação, aumentou a congelabilidade de amostras de sêmen com baixa concentração espermática [16].

Diversas correlações foram observadas entre as variáveis utilizadas para avaliação espermática através da técnica CASA, fato esse também observado por vários autores, com diferentes finalidades. Apesar da ampla variação entre animais, porcentagens combinadas da motilidade e de velocidade têm sido altamente correlacionadas com a fertilidade (0,87) aos 59 dias do não retorno ao cio [40], sugerindo que a fertilidade potencial do touro pode ser estimada, a partir da qualidade do movimento espermático.

A adição de PS de garanhões portadores de sêmen de alta motilidade ao sêmen de garanhões de baixa motilidade melhorou a motilidade pós-descongelação [11]. Em carneiros, a remoção do plasma seminal aumentou a motilidade e linearidade dos espermatozóides [13], bem como a congelabilidade do sêmen [14]. Milligan [41] observaram que espermatozóides de homens férteis e inférteis poderiam ser distinguidos com base nas medidas de velocidade espermática. Em alguns estudos, medidas de velocidade do espermatozóide têm sido correlacionadas com penetração em oócitos desprovidos de ZP, tanto em humanos quanto em hamster [42]. Correlação positiva entre o número total de espermatozóides móveis inseminados, VCL e fecundação foi observada por [43], sendo que a VCL foi capaz de predizer a fertilidade [44].

Da mesma forma, [37] observaram que os valores da VCL, VSL e do número total de espermatozóides foram positivamente correlacionados com a taxa de concepção. Os valores de VAP, VCL e VSL foram significativamente maiores em amostras que produziram mais que 50% de oócitos fertilizados do que naquelas com menos de 50% de fertilização [37].

A ALH é uma importante característica do espermatozóide, uma vez que afeta os resultados de FIV [45] e a habilidade de espermatozóides humanos penetrarem no muco cervical e fusionar com o oócito [46]. Este parâmetro indica o vigor do batimento flagelar, juntamente com a frequência de rotação da célula [47], os quais são provavelmente importantes para a progressão do espermatozóide dentro do muco cervical e envelope perioócito.

Jeulin [45] demonstraram que, a ALH de espermatozóides selecionados através da técnica de “swim-up” estava correlacionada positivamente com as taxas de fertilização, resultado confirmado por [48]. Chan et al. [49] relataram que a VCL de espermatozóides separados, por “swim-up”, foi o mais significativo fator relacionado com a FIV. Segundo [50], o BCF não teve nenhum efeito sobre a FIV ou taxa de prenhes, embora [51] tenham observado correlação positiva para essas características. Da mesma forma, a progressividade e linearidade também foram correlacionadas positivamente, em trabalho desenvolvido por [48].

De acordo com [37], a importância da VCL e da VAP, na predição da fertilização, pode mostrar a importância da capacitação no processo de fecundação, pois estas características são incrementadas após esse processo. Uma vez que a capacitação é seguida pelo desenvolvimento da hiperativação, a identificação de espermatozóides hiperativados, também, é um fator importante. Segundo [52] os parâmetros de velocidade podem ser mais úteis do que a porcentagem de espermatozóides móveis na

predição da fertilidade do sêmen de touro. Porém, a linearidade do movimento espermático tem sido relacionada significativamente com a fertilidade, em nível de campo [40].

Similarmente, a análise da IMP tem sido um dos parâmetros espermáticos mais utilizados, pois a membrana atua interagindo com as células do oviduto e oócito [51]. Nossos resultados, com maior porcentagem de IMP no grupo HoA, parecem refletir de forma esperada a melhor qualidade espermática dos touros lotados nesse grupo.

A manutenção da IMP parece estar mais intimamente relacionada com a fertilidade do sêmen do que com a motilidade, mas somente quando um grande número de espermatozóides é contado [54]. Os danos causados às membranas espermáticas promovem a perda de componentes celulares, diminuindo a viabilidade e motilidade pós-descongelação [55].

A PIV tem sido eleita como um dos melhores parâmetros para se estimar o potencial fertilizante do sêmen. A maior taxa de fertilização ($P<0,05$) observada para o grupo PSH sugere um efeito benéfico da substituição do PS do sêmen de touros considerados como tendo sêmen de média congelabilidade pelo PS de touros com sêmen de alta congelabilidade, foi benéfica. Resultados semelhantes foram obtidos por [56], os quais relataram que a adição de PS bovino ao sêmen de búfalo africano, pós-descongelação, aumentou a habilidade dos espermatozóides para fertilizar oócitos bovinos *in vitro*, fornecendo evidências que o PS heterólogo tem um efeito positivo sobre a fertilidade do espermatozóide. De modo similar, [17] observaram que os espermatozóides colocados em meio contendo PS de animais de alta fertilidade tiveram maior habilidade para penetrar em oócitos *in vitro* do que aqueles em meio contendo PS de animais de baixa fertilidade.

Diversos pesquisadores [57-63] relataram que tanto a taxa de clivagem como a de formação de blastocistos pode ser utilizada como ferramenta para predizer a fertilidade de um touro, em nível de campo, ou distinguir entre touros de diferentes fertilidades; porém, segundo [64]. Kreysing [65], mencionaram que somente a taxa de clivagem estava correlacionada com fertilidade de touros *in vivo*, uma vez que a produção de blastocistos está mais relacionada com as condições de cultura dos embriões.

De acordo com [66], a taxa de clivagem, após a fertilização *in vitro*, é o melhor teste disponível para expressar a fertilidade, pois requer espermatozóides móveis, com morfologia normal e capacidade para ativar o oócito [36]. Esse procedimento proporciona a avaliação das interações entre oócito e espermatozóide, que ocorrem durante a fertilização, permitindo, ainda, o monitoramento das fases iniciais do desenvolvimento embrionário [67].

Relatos em diferentes espécies sugerem que o PS contém fatores que podem influenciar a fertilidade, como observado em comparações da fertilidade de diferentes machos ou mediante isolamento de fatores que facilitam ou inibem a capacitação, fertilização e/ou eventos relacionados [9]. Contudo, outros autores não observaram relação entre FIV e fertilidade, em nível de campo, concluindo que este procedimento não é ideal para se avaliar a fertilidade *in vivo* [68-70].

Ward et al. [63] visando verificar os efeitos da redução da concentração espermática, durante a FIV, sobre a habilidade de se diferenciar touros de alta e baixa fertilidade *in vivo*, constataram que touros com as mais altas taxas de fertilidade, em nível de campo e na FIV, mostraram um acentuado declínio na taxa de fertilização *in vitro*, à medida que a concentração dos espermatozóides foi decresceu, diminuindo, assim, a possibilidade de se distinguir touros de alta ou baixa fertilidade *in vitro*. Mais

recentemente, [71] utilizaram as taxas de fertilização, bem como os dados de PIV para comparar o sêmen congelado sexado e não sexado.

Naib et al. [72] empregaram as técnicas de penetração em muco e de PIV para avaliar o sêmen de touros classificados como tendo alta (AF) ou baixa fertilidade (BF), em nível de campo. Concluíram que, os espermatozoides de touros AF foram mais efetivos em penetrar o muco artificial e fertilizar os oócitos, embora a taxa de produção de embriões tenha sido similar entre os dois grupos de touros. Estimativa da fertilidade de touros, mediante análise de resultados de PIV e de IATF, também foi relatada por [73], os quais avaliaram os dados através do modelo de inferência estatística de Bayesian.

Em relação aos dados da concentração de testosterona plasmática, nenhuma diferença significativa foi constatada para as médias entre os dois grupos de sêmen homospérmico. A concentração de testosterona plasmática foi mais elevada para os padrões eletroforéticos D e E do que o C, sugerindo uma influência do PE sobre a concentração desse hormônio esteróide.

Nossos resultados, com valores mínimo e máximo de 2,35 e 11,09 ng/mL, respectivamente, foram similares aos relatados por [18], os quais mencionaram valores variando de 2 a 20 ng/mL, em estudo conduzido com touros *Bos taurus taurus*. Contudo, foram maiores do que aqueles descritos por [20] trabalhando com touros da raça Nelore (3,1 e 4,1 ng/mL) e Canchim (1,2 e 2,1 ng/mL). Tais variações podem ter ocorrido em virtude do horário de colheita das amostras, idade do animal e/ou grau de excitação. No presente trabalho as colheitas de sangue foram efetuadas logo após a colheita do sêmen, o que pode explicar os maiores valores obtidos em comparação com os achados de [20] para as duas raças estudadas.

Esse autor observou, também, correlações entre a concentração plasmática de testosterona com o volume, concentração do ejaculado, circunferência escrotal e capacidade de serviço. Andersson [22] relatou correlação positiva entre a concentração de testosterona sérica e a fertilidade de touros, constatada através da taxa de não retorno ao cio. Constatou, também, que os animais com sêmen apresentando maior motilidade espermática apresentaram, em média, maior concentração de testosterona. Katongole et al. [18] observaram um padrão cíclico de liberação de LH, com 5 a 10 picos durante as 24 horas, sendo que cada um dos picos de LH estava associado a um pico de testosterona, diferente do observado por [19] e [20], os quais verificaram, em média, três picos de testosterona.

No estudo de [74], a testosterona não foi influenciada pelos diferentes níveis de concentrado e lipídeos das dietas, tendo variado de 0,1 a 9,0 ng/mL, entretando, foi observado diferença da concentração de testosterona dos animais em relação aos horários de coleta, que apresentaram maiores valores às 00h30, em relação às 4h30 e 12h30.

Estudos de eletroforese do PS ainda são limitados. Nesta pesquisa, sete padrões eletroforéticos de proteínas do PS foram identificados, com número de bandas variando de 20 a 25 (Fig. 1). Estes achados foram superiores ao número de frações (11) relatadas por [75] os quais conduziram os primeiros estudos sobre eletroforese do PS bovino e, também, das 7 a 8 bandas detectadas por [27] e 7 a 9 [24], confirmando a heterogeneidade entre raças e indivíduos. O PE classificado como A, apresentou um maior número de variáveis com médias mais altas em comparação com os outros padrões, após análise computadorizada. Esse achado pode ser reflexo da composição protéica do PS [9].

Segundo [76] a presença de uma fração protéica (entre 12 e 14 kDa) no PS é prejudicial para os espermatozóides, durante a congelação, contudo, sua remoção, através de diálise, melhorou a congelabilidade do sêmen. Proteínas relacionadas com baixa (16 kDa, pi de 6,7 e 16 kDa, com pi de 4,1) e com alta fertilidade (26 kDa e 55kDa) também foram descritas por [25]. Castro et al. [26], estudando o perfil das proteínas do PS, em touros da raça Gir, identificaram elevada concentração de uma proteína (61,8 kDa) no sêmen de alta congelabilidade, sugerindo um possível marcador bioquímico para predizer o potencial de criopreservação do sêmen bovino. No PS de suínos, [29] observaram a presença de nove bandas polipeptídicas com pesos moleculares variando de 11,97 a 122,52 kDa; concluíram que a presença do polipeptídeo de 26,58 kDa estava associado com a baixa IMP do espermatozóide, pós-descongelação.

Entretanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada para a concentração de proteína total do PS entre os grupos HoA e HoM, com o maior ($50,64 \pm 2,63$ mg/mL) e o menor ($19,59 \pm 1,43$ mg/mL) valor, respectivamente, observado para o grupo HoA e HoM. Esses valores foram inferiores aos relatados por [31], [28] e [24], com 5,17 a 6,08 g%, 3 a 8 g% e 8 a 24, 36 g/dL, respectivamente, podendo ser em decorrência da dieta oferecida ou variação racial. A presença de dois touros em cada grupo, com as maiores médias, sugere que o PE das proteínas pode ser mais importante do que a concentração de PT no estabelecimento de amostra de sêmen com melhor qualidade. O padrão eletroforético D apresentou médias de proteína total superiores aos demais PE, exceção ao PE tipo G.

Concluindo, os resultados mostraram um efeito benéfico do PSH sobre as taxas de clivagem, mas não para todos os testes utilizados neste experimento, exceção para a integridade da membrana plasmática. Além disso, o perfil eletroforético das proteínas

do PS, de concentração de testosterona e de proteína total variaram entre touros. Assim, um ensaio de campo deve ser realizado, a fim de melhor compreender esses achados

Referências

- [1] United States Department of Agriculture (USDA). Site Disponível em: <http://www.usdabrazil.org.br/home/about-usda-brazil.asp>
- [2] LOWMAN, B.G.; SCOTT, N.A.; SCOTT, P.R. Na evaluation of some breeding management options in beef o herds in the United Kingdon. Veterinary Record 1994; 135: 9-12.
- [3] AIRES, V.A.; HINSCH, K.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. Theriogenolog 2003; 60: 269-279.
- [4] AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl[®], a commercial egg yolk extender. Theriogenology 2004; 61: 895-907.
- [5] TANAJURA NETO, J.A.; MARTINS Jr. A.; CALEGARI, R.S.; SILVA. C.; CRESPILOHO, A.M. Effects of seminal plasma removal on spermatological motion and in vitro embryo production. Reproduction and Biotechnology 2008:213.
- [6] DZIUK, P.J. Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination. Animal Reproduction Science 1995; 43: 65-88, 1995.
- [7] FLINT, A.F.; CHAPMAN, P. L.; SEIDEL Jr., G.E. Fertility assessment through heterospermic insemination of flow-sorted sperm in cattle. Journal Animal Science., v. 81, p.1814-1822, 2003.
- [8] PERNOT, E.; SZUMOWSKI, P. Étude életraphoretique et immunoeletraphoretique dès protéins du plasma seminal de taureau. Bull. Soc. Chim. Biol.,v.40, n.11, p.1423-1434, 1958.

- [9] MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology Reproduction* 1990; 42:899-915.
- [10] GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; ALLEN, C.H. Effect of sêmen dilution on bovine sperm viability as determined by dual-DNA staining and flow cytometry. *Journal Andrology* 1997; 18: 324-331.
- [11] AURICH, J.E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 1996; 46: 791-797.
- [12] AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science* 2008; 107: 268-275.
- [13] GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; HAARD, M.C.; HAARD, M.G.M.; JOHANISSON, A.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus® and Triladyl®. *Reproduction in Domestic Animal* 2000;35:69-77.
- [14] OBA, E.; DELLAQUA Jr., J.A.; SOUSA, D.B.; PAPA, F.O.; BICUDO, S.D.; MACEDO, L.P. Influence of centrifugation and removal of seminal plasma in cryopreservation of ram semen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal. Revista Brasileira de Reprodução Animal* , 2004; 2 (1): 481-481.
- [15] ROTA, A.; STROMB, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and tree extender on canine semen stored at 4 °C. *Theriogenology* 1995;44: 885-990, 1995.
- [16] LÓPEZ, A.R.; ENCALADA, SW. Efecto de la remoción parcial del plasma seminal sobre la congelabilidad del sêmen bovino. *Ver. Biom.* 1997; 8: 21-25.
- [17] HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. *Journal Reproduction Fertility* 1996; 2:199-204.

- [18] KATONGOLE, C.B., NAFTOCIN, F., SHORT, R.U. Relationship between blood levels of luteinizing hormone and testosterone in bull, and effects of sexual stimulation. *Journal Endocrinology* 1971; 50(3): 457-466.
- [19] SANWAL, P.C., SUNDBY, A., EDQVIST, L.E.. Diurnal variation of peripheral plasma levels of testosterone in bulls measured by a rapid radioimmunoassay procedure. *Acta Vet. Scand.*, 1974; 15(1): 90-99.
- [20] BARBOSA, R.T. *Comportamento sexual, biometria testicular, aspectos do sêmen e níveis plasmáticos de testosterona em touros Canchim e Nelore*. Belo Horizonte: UFMG/Escola de Veterinária, Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais 1987:135f.
- [21] POST, T.B., CHRISTENSEN, H.R. Testosterone variability and fertility in bulls. *Theriogenology* 1976; 6: 615-616.
- [22] ANDERSSON, M. Relationship between GnRH-induced maxima, sperm motility and fertility in Ayrshire bulls. *Animal Reproduction Science* 1992; 27 (2): 107-111.
- [23] KILLIAN, G.J. Fertility factors in seminal plasma. *Proceedings of the 14th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction*, 1992.
- [24] MARTINS JÚNIOR, A. Polimorfismo genético-bioquímico das proteínas do sangue e do plasma seminal de touros doadores de sêmen. 1993. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”: 190f.
- [25] KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction* 1993; 49: 1202-1207.
- [26] RONCOLLETTA, M.; FRANCESCHINI, P.H.; LIMA, V.F.M.H.; RODRIGUES, L.H.; OLIVEIRA, M. A.; SILVA, C. Perfil em SPS_PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça Gir. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 1999: 36.
- [27] BHATT, G.N.; VYAS, K.K.; PUROHIT, S.K.; JATKAR, P.R. A note on the comparative electrophoretic pattern of seminal plasma of exotic and indigenous bulls. *Indian Journal Animal Science* 1979; 49: 224-226.

- [28] CASTRO, T.A.M.G.; MACHADO, C.E.P.; LIEPTIN, N.R. Níveis de proteína total e eletroforese das proteínas do plasma seminal de bovinos do Ecótipo Mantiqueira. B. Industr. Anim., 1986; 43: 37-44.
- [29] BIANCHI, I.; COLLARES, T.; CAMPOS, V.P.; CAVALCANTI, P.V.; KAEFER, C.; CORRÊA, E.K.; DELLAGOSTIN, O.A.; LUCIA JÚNIOR, T.; DESCHAMPS, J.C.; CORREA, M.N. Fator do plasma seminal associado à integridade de membrana de espermatozóides suínos pós-descongelamento. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 2008; 60: 384-388.
- [30] MANJUNATH, P.; NAUE, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. Biology of Reproduction 2002; 67: 1250-1258.
- [31] SINGH, D.M.; PANGAWKAR, G.R. HUNDAI, R.S. Studies on certain biochemical constituents of seminal plasma in exotic and crossbred bulls. Indian Veterinarian Journal 1989;. 66:1112-1115.
- [32] RATTAN, P.J.S.; RAO, M.B.; ANANTAKRISHNAN, C.P. Eletrophoretic studies on bovine semen. Indian Journal Animal Science 1972; 42: 77-84.
- [33] CALEGARI, R.S.; ROSSETO, M.R.; MARTINS Jr., A.; PASCHOAL, D.M. Método alternativo para determinação do volume do sêmen obtido de touros da raça Nelore. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 31., 2004, São Luis. Anais..... São Luiz: 89.
- [34] BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; PANICH, P.L.; JOHN, P.K. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. Theriogenology 2003; 60: 1539-1551.
- [35] GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ESTEO, M.C.; SOLER, A.J. Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. Theriogenology 2009; 71:643-650.
- [36] BRAUDMEIER, A.G.; DEMERS, J.M.; SHANKS, R.D.; SAACKE, R.G.; MILLER, D.J. Examination of the binding ability of bovine spermatozoa to the zona pellucid as an indicator of fertility. Journal of Andrology 2002; 23: 645-651.

- [37] VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analysers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002; 57: 149-179.
- [38] SAHNI, K.L. Inhibitory effect of seminal plasma on motility of bovine semen. *Indian Journal of Animal Sciences* 1990; 60: 786-788.
- [39] RODGER, J.C. Seminal plasma an unnecessary evil? *Theriogenology* 1975; 3: 237-239.
- [40] FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C; FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analyses (CASA) and relationship to fertility. *Theriogenology* 1998; 49: 871-879.
- [41] MILLIGAN, M.P.; HARRIS, S.; DENNIS, K.J. Comparison of sperm velocity in fertile and infertile groups as measured by time-lapse photography. *Fertility Sterility* 1980; 34: 509-551.
- [42] FETTERHOLF, P.M.; ROGERS, B.J. Prediction of human sperm penetrating ability using computerized motion parameters. *Molecular Reproduction Development* 1990; 27: 326-331.
- [43] BYRD, W.; BRADSHAW, K.; CAR, B.; EDMAN, C.; ODOM, J. A prospective randomized study of pregnancy rates following intrauterine and cervical insemination using frozen donor semen. *Fertility Sterility* 1990; 53: 521-527.
- [44] MARSHBURN, P.B.; McLNTIRE, D.; CARR, B.R. BYRD, W. Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine inseminations. *Fertility Sterility* 1992; 58: 179-188.
- [45] JEULIN, C.; LEWIN, L.M.; CHEVRIER, C. Changes in flagellar movement of rat spermatozoa along the length of the epididymis: Manual and computer-aided image analysis. *Cell Motility Cytoskeleton* 1996; 35: 147-161.
- [46] AITKEN, R.J.; FISHER, H. Relative oxygen generation by human spermatozoa. *Bioassays* 1994; 16: 259-268, 1994.
- [47] DAVID, G.; SEVERS, S.; JOUANNET, P. Kinematic of human spermatozoa. *Gamete Res.*, 1981; 4: 83-86.

- [48] SUKCHAREN, N.; KEITH, J.; IRVINE, D.S. Predicting the fertilizing potencial of human sperm suspensions *in vitro*: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. *Fertility Sterility* 1995; 63: 1293-1300.
- [49] CHAN, S.Y.; TSOI, W.L.; LEUNG, J.; WANG, C. The accuracy of sperm concentration determination by the automatic CellSoft semen analyzer before and after discontinuous Percoll gradient centrifugation. *Andrologia* 1990; 22:55-61.
- [50] DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E. Glutathione and hypotaurine *in vitro*: Effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis* 2000; 15: 305-314.
- [51] SUAREZ, S.S.; KATZ, D.F.; OWEN, D.H. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biology Reproduction* 1991; 44: 375-381.
- [52] TARDIF, A.L.; FARREL, P.B.; FOOTE, R.H. Computer-Assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *Journal of Dairy Science* 1997; 80: 1606-1612.
- [53] RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; ZHANG, B. R.; LARSSON, B. Bovine semen quality and the ability to produce embryos *in vivo* and *in vitro*. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS* 1997; 25 (1); 108-126.
- [54] PÉÑA, F.J.; SARAIVA, F.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Detection of early changes in sperm membrane integrity pré-freezing can estimate post-thaw quality of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2006.
- [55] SEVERO, N.C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. *A Hora Veterinária* 2009; 28: 36-39.
- [56] GERBER, D.; De HASS, K.; NÖTHLING, J.O. Effect of bovine seminal plasma on the ability of buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa to fertilize bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 2003; 59: 11-15.
- [57] MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. "Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. *Reproduction Nutrition Development* 1975; 30: 259-266.

- [58] HILLERY, F.L.; PARRISH, J.J.; FIRST, N.L. Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. *Theriogenology* 1990; 33: 249-252.
- [59] SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B.” In vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors”. *Reproduction in Domestic Animals* 1993; 28: 77-84.
- [60] LONERGAN, P. The application of in vitro fertilization techniques to the prediction of bull fertility. *Reproduction Animal Science* 1994; 29: 12-21.
- [61] ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIN, N.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Relationship between embryo development in vitro and 56 day non-return rates of cows inseminated with froze-thawed semen from dairy bulls. *Theriogenology* 1997; 48: 221-231.
- [62] WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M.; LONERGAN, P.; Paternal influence on time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Molecular Reproduction Development* 2001; 1575-1584.
- [63] WARD, F.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology* 2003; 59: 1575-1584.
- [64] KURT, J.M.; AMBROSE, J.D.; RAJAMAHENDRAN, R.; Cleavage rate of bovine oocytes in vitro is affected by bulls but not sperm concentration. *Theriogenology* 1996; 45: 257-263.
- [65] KREYSING, U.; NAGAI, T.; NIENAMAN, H. Male-dependent variability of fertilization and embryo development in two bovine in vitro fertilization system and the effects of casein phosphopeptides (CPPs). *Reproduction Fertilization Development* 1997; 9: 465-475.
- [66] AMANN, R.F.; HAMMERSTEDT, R.H. Detection of differences in fertility. *Journal Andrology* 2003; 60: 1539-1551.
- [67] GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ESTEO, M.C.; SOLER, A.J. Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, v. 71, p. 643-650, 2009.

- [68] OHGODA, O.; NIWA, K.; YURA, M.; TAKAHASHI, S.; KANOYA, K.; Variations in penetration rates in vitro of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. *Theriogenology* 1988; 29: 1375-1381.
- [69] SCHENEIDER, C.S.; ELLINGTON, J.E.; WRITE, R.W. Relationship between bull field fertility and in vitro embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. *Theriogenology* 1999; 51:1085-1098.
- [70] DHALI, A.; ANCHAMPARUTHY, V.M.; BUTLER, S.P.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. *In vitro* development of bovine embryos culture with stem factor or insulin-like growth-factor I following IVF with semen of two bull having different field fertility. *Animal Reproduction Science* 2009; 116: 188-95.
- [71] CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; MACHADO, G.M.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology* 2010; 74: 1521-1530.
- [72] NAIB, A.; HANRAHAN, J.P.; LONERGAN, P.; FAIR, S. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. Disponível: www.sciencedirect.com *Theriogenology*, In press, 2011.
- [73] SUDANO, M.J.; CRESPILO, A.M.; FERNANDES, C.B.; MARTINS JÚNIOR, A.; PAPA, F.O.; RODRIGUES, J.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F. Use of bayesian interference to correlate *in vitro* embryo production and *in vivo* fertility in Zebu bulls. 2011 *revista*, v, p.
- [74] SANTOS, M.D.; TORRES, C.A.A.; MACHADO, G.V.; COSTA, D.S.; ANGULO, L.M. Concentração sérica de testosterona em touros Zebu. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2000; 29:738-744.
- [75] LARSSON, B.L.; SALISBURY, G. W. The proteins of bovine seminal plasma. *Journal Biological Chemistry* 1954; 206:741.
- [76] GARCIA, M.A.; GRAHAM, E.F. Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. *Cryobiology* 1987; 24: 446-454.

Anexos

Tabela 1

Estatística descritiva (média e desvio padrão) das variáveis espermáticas pré-congelação (sêmen fresco) para os grupos homospérmicos e touros

Grupo	Touro	Concentração (milhões/mL)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	DM (%)	Dm (%)	Normais (%)
HoA	5	1140 ± 93,54	72 ± 2,74	5 ± 0	4,8 ± 0,8	5,6 ± 0,55	89,6 ± 1,14
	6	749 ± 157,2	71 ± 2,24	5 ± 0	4,8 ± 0,8	5 ± 1,58	90,2 ± 1,64
	7	1318 ± 354,7	78 ± 5,7	5 ± 0	5 ± 0,7	4,2 ± 1,3	90,8 ± 1,48
	8	976 ± 231,3	71 ± 2,24	5 ± 0	2,8 ± 0,8	3,8 ± 1,1	93,4 ± 1,14
	Média	1046 ± 301,8 ^a	73 ± 4,41 ^b	5 ± 0 ^a	4,3 ± 1,2 ^b	4,6 ± 1,31 ^b	91 ± 1,95 ^a
HoM	9	1314 ± 135,8	63 ± 4,47	4 ± 0,5	12,2 ± 1,3	11,8 ± 2,05	76 ± 2,45
	10	1220 ± 281,4	63 ± 2,74	4 ± 0,8	12 ± 1,6	14,2 ± 0,84	73,8 ± 1,92
	11	1038 ± 198,3	65 ± 0	4 ± 0	12,6 ± 1,8	11,6 ± 1,52	75,8 ± 3,11
	12	1190 ± 168,2	65 ± 0	4 ± 0	12 ± 0,7	12,8 ± 0,84	75,2 ± 0,84
	Média	1191 ± 212,5 ^a	64 ± 2,62 ^a	4 ± 0,5 ^b	12,2 ± 1,3 ^a	12,6 ± 1,67 ^a	75,2 ± 2,24 ^b

^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si ($P < 0,05$).

Tabela 2

Valores da média e desvio padrão das variáveis da cinética espermática para os grupos heterospermico e homospermicos e touros

Grupo	Touro	MT (%)				MP (%)				VAP (um/s)						
PSH	Bo/Po	42,40	±	13,45	c	C	31,80	±	11,08	b	B	83,32	±	4,95	bc	CDE
	Ca/Av	66,60	±	9,96	b	ABC	46,20	±	9,78	a	AB	91,04	±	3,92	b	ABCD
	Vo/Ch	60,00	±	13,78	b	ABC	46,00	±	10,20	a	AB	76,10	±	4,81	c	E
	Ke/Ma	83,40	±	5,18	a	A	52,60	±	5,03	a	AB	101,94	±	12,18	a	AB
	Média	63,10	±	18,21	*		44,15	±	11,58	*		88,10	±	11,88	*	
HoA	Vo	64,40	±	15,77	a	ABC	45,60	±	13,16	a	AB	79,32	±	7,32	c	DE
	Ke	73,40	±	7,02	a	AB	50,00	±	4,18	a	AB	88,16	±	7,11	b	BCDE
	Bo	75,60	±	5,41	a	A	53,00	±	5,83	a	A	97,88	±	3,75	a	AB
	Ca	74,40	±	12,46	a	AB	52,40	±	8,56	a	AB	89,16	±	5,61	b	ABCDE
	Média	71,95	±	11,06	*		50,25	±	8,47	*		88,63	±	8,77	*	
HoM	Po	49,60	±	13,43	c	BC	33,40	±	11,63	b	AB	90,14	±	3,97	b	ABCDE
	Ma	83,00	±	3,08	a	A	51,60	±	4,67	a	AB	102,78	±	10,12	a	A
	Ch	65,80	±	14,39	b	ABC	48,40	±	10,01	a	AB	80,78	±	5,49	c	DE
	Av	68,80	±	16,71	ab	AB	43,40	±	15,29	b	AB	95,84	±	4,11	ab	ABC
	Média	66,80	±	17,05	*		44,20	±	12,38	*		92,39	±	10,16	*	

^{a,b,c} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, dentro do mesmo grupo, diferem entre si (P<0,05). ^{A,-E} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si (P<0,05). * Médias, na coluna, não diferem significativamente entre si (P>0,05).

Tabela 3
Valores da média e desvio padrão das variáveis da cinética espermática para os grupos heterospérmico e homospérmicos e touros

Grupo	Touro	VSL (um/s)			VCL (um/s)			ALH (um)		
PSH	Bo/Po	66,80	± 2,66	bc B	142,02	± 13,69	b CDEF	5,94	± 0,69	b ABCD
	Ca/Av	70,24	± 2,02	b AB	153,52	± 10,41	b ABCDE	6,18	± 0,44	b ABC
	Vo/Ch	63,94	± 3,02	c B	119,22	± 10,42	c F	4,84	± 0,53	c D
	Ke/Ma	75,96	± 7,71	a A	177,44	± 24,87	a AB	7,12	± 0,77	a A
Média		69,24	± 6,16	*	148,05	± 26,05	*	6,02	± 1,01	*
HoA	Vo	63,44	± 4,56	c B	129,52	± 16,02	b DEF	5,42	± 0,66	b BCD
	Ke	67,84	± 4,08	bc AB	147,62	± 16,30	ab BCDEF	5,94	± 0,71	ab ABCD
	Bo	76,06	± 3,29	a A	160,74	± 6,97	a ABCD	6,40	± 0,34	a ABC
	Ca	70,40	± 2,80	b AB	143,80	± 13,02	ab CDEF	5,60	± 0,53	b BCD
Média		69,44	± 5,81	*	145,42	± 16,92	*	5,84	± 0,65	*
HoM	Po	67,98	± 1,87	b AB	155,06	± 9,15	b ABCDE	6,46	± 0,55	a ABC
	Ma	75,80	± 5,26	a A	179,58	± 21,90	a A	7,20	± 0,78	a A
	Ch	66,04	± 3,43	b B	128,56	± 10,76	c EF	5,24	± 0,40	b CD
	Av	70,24	± 5,02	b AB	164,32	± 7,94	ab ABC	6,66	± 0,32	a AB
Média		70,02	± 5,33	*	156,88	± 22,77	*	6,39	± 0,89	*

^{a,b,c} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, dentro do mesmo grupo, diferem entre si (P<0,05). ^{A-F} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si (P<0,05). * Médias, na coluna, não diferem significativamente entre si (P>0,05).

Tabela 4

Valores da média e desvio padrão das variáveis da cinética espermática para os grupos heterospérmico e homospérmicos e touros

Grupo	Touro	BCF (Hz)				STR (%)				LIN (%)			
PSH	Bo/Po	28,24	±	1,93	ab ABCD	81,60	±	2,61	ab AB	50,60	±	3,78	b ABCD
	Ca/Av	26,44	±	1,82	bc ABCD	78,20	±	2,05	b BCD	49,00	±	1,87	b BCD
	Vo/Ch	31,16	±	2,80	a A	84,60	±	2,07	a A	56,80	±	3,27	a A
	Ke/Ma	24,18	±	2,55	c D	74,60	±	2,97	c CD	44,60	±	3,05	c D
	Média	27,51	±	3,37	*	79,75	±	4,45	*	50,25	±	5,30	*
HoA	Vo	29,62	±	2,96	a AB	80,60	±	2,61	a AB	52,20	±	3,42	a ABC
	Ke	27,16	±	2,02	ab ABCD	78,20	±	2,59	a BCD	49,20	±	3,70	a BCD
	Bo	24,90	±	1,78	b BCD	77,80	±	1,64	a BCD	49,20	±	2,17	a BCD
	Ca	28,46	±	1,65	a ABCD	80,40	±	3,05	a ABC	52,80	±	3,56	a ABC
	Média	27,54	±	2,68	*	79,25	±	2,65	*	50,85	±	3,45	*
HoM	Po	25,32	±	2,20	b BCD	77,00	±	3,74	b BCD	47,20	±	3,42	b CD
	Ma	24,00	±	2,74	b D	74,00	±	3,08	b D	44,40	±	3,36	b D
	Ch	29,28	±	2,06	a ABC	82,20	±	2,05	a AB	54,20	±	2,17	a AB
	Av	24,26	±	2,85	b CD	74,40	±	3,71	b D	45,00	±	3,74	b D
	Média	25,72	±	3,15	*	76,90	±	4,47	**	47,70	±	4,97	*

^{a,b,c} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, dentro do mesmo grupo, diferem entre si (P<0,05). ^{A-D} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si (P<0,05). *,** Médias, dentro da coluna, diferem significativamente entre si (P>0,05).

Tabela 5

Valores da média e desvio padrão da rapidez do espermatozóide e da integridade de membrana plasmática para os grupos heterospermico e homospermicos e touros

Grupo	Touro	RAP (%)				IMP (%)			
PSH	Bo/Po	39,60	±	12,66	c D	26,00	±	9,45	b BCD
	Ca/Av	63,60	±	9,71	b ABCD	21,00	±	7,31	b CD
	Vo/Ch	55,20	±	13,52	b BCD	25,30	±	6,12	b BCD
	Ke/Ma	81,00	±	5,61	a A	46,70	±	10,47	a AB
	Média	59,85	±	18,27	*	29,75	±	12,87	**
HoA	Vo	59,80	±	15,39	a ABCD	38,10	±	6,69	a ABCD
	Ke	69,20	±	7,60	a ABC	38,10	±	12,25	a ABCD
	Bo	73,60	±	6,02	a AB	36,90	±	9,48	a ABCD
	Ca	71,20	±	12,32	a ABC	49,50	±	12,12	a A
	Média	68,45	±	11,42	*	40,65	±	10,89	*
HoM	Po	47,80	±	13,70	c CD	16,60	±	10,08	b D
	Ma	80,60	±	3,78	a AB	40,30	±	14,44	a ABC
	Ch	62,20	±	14,41	bc ABCD	28,10	±	11,57	ab ABCD
	Av	66,00	±	17,18	ab ABC	34,20	±	9,66	a ABCD
	Média	64,15	±	17,08	*	29,80	±	13,92	**

^{a,b,c} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, dentro do mesmo grupo, diferem entre si (P<0,05). ^{A-D} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si (P<0,05).). *, ** Médias, dentro da coluna, diferem significativamente entre si (P>0,05).

Tabela 6

Coeficiente de correlação entre as variáveis da análise computadorizada do sêmen.

Variáveis		Coeficiente de correlação ⁽¹⁾
		Experimento
IMP (%)	MT (%)	0,649
MP (%)	IMP (%)	0,626
MP (%)	MT (%)	0,927
MT (%)	IMP (%)	0,645
Rap (%)	MT (%)	0,997
VAP (um/s)	VSL (um/s)	0,910
VAP (um/s)	VCL (um/s)	0,977
VAP (um/s)	ALH (um)	0,922
VSL (um/s)	VCL (um/s)	0,831
VSL (um/s)	ALH (um)	0,733
VCL (um/s)	ALH (um)	0,976
BCF (Hz)	VAP (um/s)	-0,803
BCF (Hz)	VCL (um/s)	-0,859
BCF (Hz)	VSL (um/s)	-0,539
STR (%)	VAP (um/s)	-0,830
STR (%)	VCL (um/s)	-0,882
STR (%)	VSL (um/s)	-0,534
LIN (%)	VAP (um/s)	-0,811
LIN (%)	VCL (um/s)	-0,945
LIN (%)	VSL (um/s)	-0,525
RAP (%)	MP (%)	0,910
RAP (%)	VSL (um/s)	0,527
BCF (Hz)	LIN (%)	0,939
STR (%)	LIN (%)	0,964

⁽¹⁾ P < 0,0001

Tabela 7

Influência do sêmen homospérmico e do sêmen reconstituído com PS heterólogo sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Grupo	n oócitos	Desenvolvimento embrionário – n (%)		
		Fertilizados 72 h*	Mo/Bl 144 h	Bl/Bx/Be 168 h
HoA	131	105 (80,15) ^b	59 (45,04) ^a	45 (34,35) ^a
HoM	128	99 (77,34) ^b	56 (43,75) ^a	48 (37,50) ^a
PSH	130	120 (92,31) ^a	66 (50,77) ^a	52 (40,00) ^a

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem significativamente entre si (P<0,05).

* Desenvolvimento temporal – h pi.

Dados de seis repetições foram agrupados.

Tabela 8
Resultados da média ($\pm$ DP) para a testosterona plasmática e proteína total do plasma seminal de touros da raça Nelore.

Grupo	Touro	Testosterona ⁽¹⁾				PT ⁽²⁾			
		ng/dL				mg/mL			
HoA	Vo	833,81	$\pm$	225,46	a ABC	49,18	$\pm$	2,40	a AB
	Bo	494,99	$\pm$	151,34	b ABCD	37,43	$\pm$	1,89	b C
	Ca	856,34	$\pm$	246,90	a AB	50,64	$\pm$	2,63	a A
	Ke	373,41	$\pm$	104,60	b CD	29,45	$\pm$	0,07	c BC
	Média	639,64	$\pm$	277,66		41,67	$\pm$	9,45	
HoM	Po	235,29	$\pm$	152,58	c D	41,63	$\pm$	2,59	a C
	Ma	900,97	$\pm$	351,80	ab AB	42,42	$\pm$	1,47	a BC
	Ch	671,57	$\pm$	136,71	b ABCD	19,59	$\pm$	1,43	c E
	Av	1109,41	$\pm$	326,70	a A	28,08	$\pm$	1,16	b D
	Média	729,31	$\pm$	410,17		32,93	$\pm$	10,33	

^{a,b,c} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, dentro do mesmo grupo, diferem entre si ($P < 0,05$). ^{A-D} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si ($P < 0,05$). ⁽¹⁾ Não existe diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$). ⁽²⁾ Existe diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

Tabelas 9

Média e desvio padrão das variáveis de cinética espermática e integridade de membrana plasmática, conforme os padrões eletroforéticos das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore.

PE	MT(%)			MP (%)			VAP (um/s)			VSL (um/s)			VCL (um/s)			ALH (um)			BCF (Hz)			STR (%)			LIN (%)			RAP (%)			IMP (%)		
A	79,3	± 5,7	^a	52,3	± 5,03	^a	100,3	± 7,64	^a	75,93	± 4,14	^a	170,16	± 18,26	^a	6,8	± 0,71	^a	24,45	± 2,23	^b	75,9	± 3,07	^{bc}	46,8	± 3,68	^{bc}	77,1	± 6,01	^a	38,6	± 11,65	^{ab}
B	65,8	± 14,39	^{ab}	48,4	± 10,01	^{ab}	80,78	± 5,49	^c	66,04	± 3,43	^b	128,56	± 10,76	^b	5,24	± 0,4	^c	29,28	± 2,06	^a	82,2	± 2,05	^a	54,2	± 2,17	^a	62,2	± 14,41	^{ab}	28,1	± 11,57	^{bc}
C	49,6	± 13,43	^b	33,4	± 11,63	^b	90,14	± 3,97	^{abc}	67,98	± 1,87	^b	155,06	± 9,15	^{ab}	6,46	± 0,55	^{ab}	25,32	± 2,2	^{ab}	77	± 3,74	^{abc}	47,2	± 3,42	^{bc}	47,8	± 13,7	^b	16,6	± 10,08	^c
D	74,4	± 12,46	^a	52,4	± 8,56	^a	89,16	± 5,61	^{abc}	70,4	± 2,8	^{ab}	143,8	± 13,02	^{ab}	5,6	± 0,53	^c	28,46	± 1,65	^{ab}	80,4	± 3,05	^{ab}	52,8	± 3,56	^{ab}	71,2	± 12,32	^a	49,5	± 12,12	^{ab}
E	68,8	± 16,71	^{ab}	43,4	± 15,29	^{ab}	95,84	± 4,11	^{abc}	70,24	± 5,02	^{ab}	164,32	± 7,94	^a	6,66	± 0,32	^{ab}	24,26	± 2,85	^b	74,4	± 3,71	^c	45	± 3,74	^c	66	± 17,18	^{ab}	34,2	± 9,66	^{abc}
F	73,4	± 7,02	^a	50	± 4,18	^{ab}	88,16	± 7,11	^{bc}	67,84	± 4,08	^b	147,62	± 16,3	^{ab}	5,94	± 0,71	^{bc}	27,16	± 2,02	^{ab}	78,2	± 2,59	^{abc}	49,2	± 3,7	^{abc}	69,2	± 7,6	^{ab}	38,1	± 12,25	^{ab}
G	64,4	± 15,77	^{ab}	45,6	± 13,16	^{ab}	79,32	± 7,32	^c	63,44	± 4,56	^b	129,52	± 16,02	^b	5,42	± 0,66	^c	29,62	± 2,96	^a	80,6	± 2,61	^{ab}	52,2	± 3,42	^{ab}	59,8	± 15,39	^{ab}	38,1	± 6,69	^{ab}

^{a,b,c} Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem significativamente entre si (P < 0,05).

Tabela 10

Média e desvio padrão das mensurações de proteína total do plasma seminal e de testosterona plasmática, conforme o padrão eletroforético das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore.

PE	PT (mg/mL)			Testosterona (ng/dL)		
A	39,92	± 3,20	c	697,98	± 333,12	abc
B	19,59	± 1,43	e	671,57	± 136,71	abc
C	41,63	± 2,59	bc	235,29	± 152,58	c
D	50,64	± 2,63	a	856,34	± 246,90	a
E	28,08	± 1,16	de	1109,41	± 326,70	a
F	29,45	± 0,07	d	373,41	± 104,60	bc
G	49,18	± 2,40	ab	833,81	± 225,46	ab

^{a-e} Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

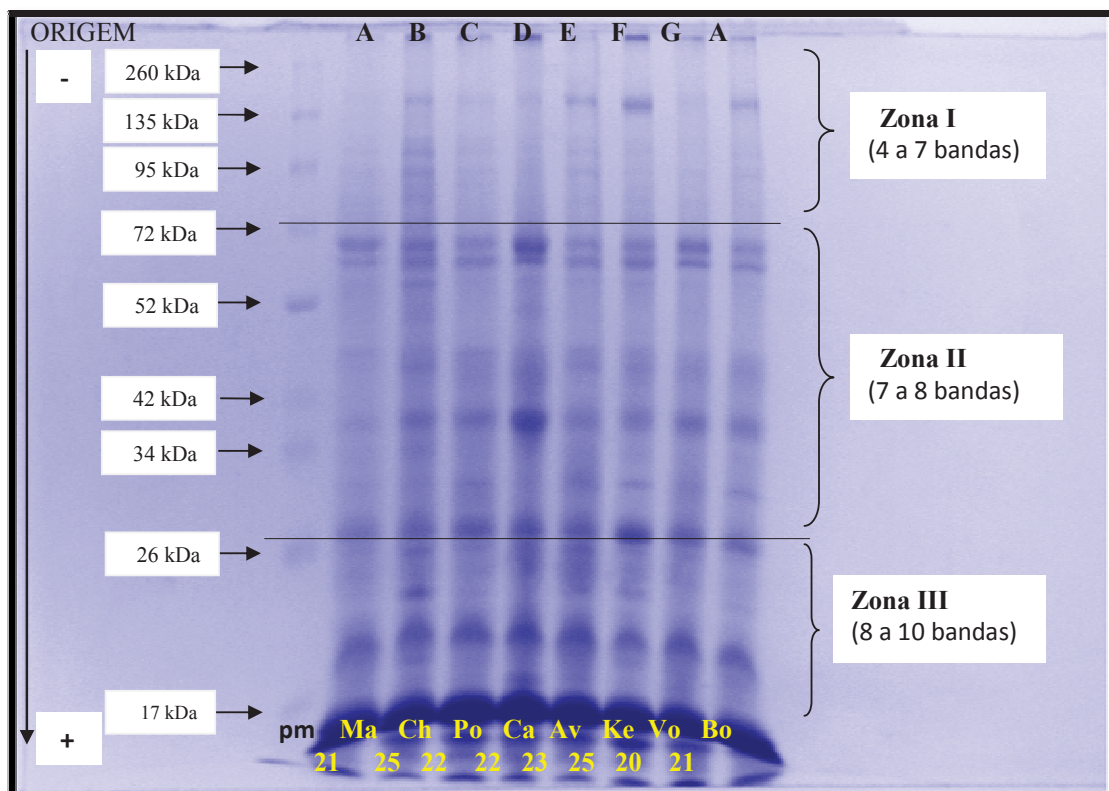


Fig. 1. Eletroferograma dos padrões de proteínas do plasma seminal de touros portadores de sêmen de alta e média congelabilidade, da raça Nelore, fracionadas em eletroforese vertical (SDS-PAGE 10%).

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- 1 - não houve diferença entre o sêmen heterospermico e homospermico para os parâmetros espermáticos, avaliados através da técnica de análise computadorizada e integridade de membrana plasmática, independentemente da amostra seminal ser de alta ou média congelabilidade;
- 2 - que as amostras seminais dos touros apresentaram significativa variação nas médias dos parâmetros espermáticos, independentemente do grupo, caracterizando distinta individualidade entre os animais;
- 3 - o sêmen heterospermico não promoveu aumento nas taxas de fertilização *in vitro* e nem na formação de mórulas e blastocistos, em comparação com o sêmen homospermico;
- 4 - não houve diferença entre o sêmen reconstituído com plasma seminal heterólogo e homospermico para os parâmetros espermáticos, avaliados através da técnica de análise computadorizada;
- 5 - o melhor resultado de integridade de membrana plasmática no grupo de touros classificados como tendo sêmen de alta congelabilidade parece refletir a melhor qualidade espermática desses reprodutores;
- 6 - o sêmen reconstituído com PSH foi efetivo em aumentar as taxas de fertilização *in vitro*, provavelmente devido à presença de fatores benéficos no plasma seminal de touros portadores de sêmen de alta congelabilidade;
- 7 - o sêmen reconstituído com PSH não proporcionou aumento da porcentagem de mórulas e blastocistos produzidos *in vitro*, possivelmente em decorrência da composição do meio cultivo;
- 8 - não houve diferença significativa entre a concentração de testosterona plasmática e os grupos de alta e media congelabilidade;

9 - houve diferença significativa entre a concentração de proteína do plasma seminal e os grupos de alta e media congelabilidade, porém, as maiores médias de PT foram obtidas no grupo de sêmen com alta congelabilidade;

10 - as proteínas do plasma seminal caracterizaram-se por apresentar sete padrões de migração eletroforética (A, B, C, D, E, F e G), constando de 20 a 25 bandas, distribuídas em três regiões principais (I, II e III);

11 - maior número de bandas foi detectado na zona III, a qual, também, revelou a presença de bandas mais difusas e intensamente coradas, enquanto que um menor número de bandas, mais estreitas e fracamente coradas, foi observado na zona I;

12 - o padrão eletroforético classificado como A, apresentou um maior número de variáveis com médias mais altas em comparação com os outros padrões, após análise computadorizada do sêmen;

13 - a concentração de testosterona plasmática foi mais elevada para os padrões eletroforéticos D e E do que o C, sugerindo uma influência do PE sobre a concentração desse hormônio esteróide;

14 - o padrão eletroforético D apresentou médias de proteína total superiores aos demais PE, exceção ao PE G;

15 - inúmeras correlações, positivas e negativas, foram observadas entre a maioria das variáveis estudadas através da técnica CASA, nos dois experimentos.

BIBLIOGRAFIA

CALEGARI, R.S. “Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*”

5. BIBLIOGRAFIA

ABAIGAR, T.; WOLT, W.; HARRISON, R.; DEL BARRIO, G. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhor*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Reproduction*, v. 122, p. 265-273, 1999.

ACOTT, T.S.; HOSKINS, D.D. Bovine sperm forward motility protein: Partial purification and characterization. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 253, p. 6744-6750, 1978.

AGAR, N.S.; RAWAT, J.S.; ROY, A. Eletrophoretic pattern of seminal plasma and blood serum proteins of farm animals. *Indian Journal Dairy Science*, v. 18, p. 101-103, 1965.

AIRES, V.A.; HINSCH, K.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, v. 60, p. 269-279, 2003.

AITKEN, R.J.; FISHER, H. Relative oxygen generation by human spermatozoa. *Bioassays*, v. 16, p. 259-268, 1994.

AITEKEN, R.J. Sperm function testes and fertility. *International Journal of Andrology*, v. 29, p. 69-75, 2006.

ALBRECHT, A.; GAVIA, R.; MIGLIARO, F.G.; BROGLIATTI, G. Heterospermic insemination at two sperm concentrations in timed AI: CASA semen parameters and pregnancy rates, v. 17(2), p. 154, 2005.

AMANN, R.P. Can the fertility potencial of a seminal sample be predicted accurately. *Journal Andrology*, v. 10, p. 89-98, 1989.

AMANN, R.F.; HAMMERSTEDT, R.H. Detection of differences in fertility. *Journal Andrology*, v. 60, p. 1539-1551, 2003.

AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl[®], a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, v. 61, p. 895-907, 2004.

ANDERSSON, M. 1992. Relationship between GnRH-induced maxima, sperm motility and fertility in Ayrshire bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, 27(2):107-111.

ANZAR, M.; HE, L.; BURH, M.M.; KROESTSCH, T.G.; PAULS, K.P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull sêmen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol. Reprod.*, v. 66, p. 354-360, 2002.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science*, v. 107, p. 268-275.

AURICH, J.E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa aftwer cryopreservation. *Theriogenology*, v. 46, p. 791-797, 1996.

CALEGARI, R.S. “Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*”

AUTIERO, M.; SANSONE, G.; ABRECCIA, P. Relative ratios of lactoferrin, albumin, and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertility and infertility men. *Journal Andrology*, v. 12, p. 191-200, 1991.

ARRUDA, R.P. Avaliação do efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozoides equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). São Paulo, 2000. 85p. Tese (Livre Docência) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo.

AZMAL, S.A.; AMIN, M.R.; GOSWAMI, P.C.; MOSTARI, M.P. KHATUM. R. Relative merits of Homo and Heterospermic bull semen in respect of fertility. *Pakistan Journal Biological Science*, v.7, n. 11, p. 1912-1917, 2004.

AWAD, M.M.; Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 123, p. 157-162, 2011

BAAS, J.W.; MOLAN, P.C.; SHANONNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *J. reprod. Fertil.*, v. 68, p. 275-280, 1983.

BAILEY, J.; BILOUDEAU, J.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capaciting phenomenon. *Journal Andrology*, v. 21, p. 1-7, 2000.

BARBOSA, R.T. *Comportamento sexual, biometria testicular, aspectos do sêmen e níveis plasmáticos de testosterona em touros Canchim e Nelore*. Belo Horizonte: UFMG/Escola de Veterinária, 1987. 135p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1987.

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGU, M.; TATO, A.; OSADA, J. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on RAM sperm membrane. *Biology of Reproduction*, v.63, p. 1531-1537, 2000.

BEATTY, R.A. Relation between genetic constitution of an offspring and weight of its litter-mates. *Nature*, v. 178, p. 48, 1956.

BEATTY, R.A. An experiment with heterospermic insemination in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 19, p. 491-502, 1969.

BEATTY, R.A. Evaluation by the heterospermic insemination technique of the differential effect of freezing at -196°C on fertility of individual bull semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 47, p. 377-379, 1975.

BEDFORD, S.J.; GRAHAM, J.K.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Use of two freezing extenders to cool stallion spermatozoa to 5°C with and without seminal plasma. *Theriogenology*, v. 43, p. 939-953, 1995.

BELLIN, M.E.; OYARZO, J.N.; HAWKINS, H.E. et al. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *Jornal Animal Science*, v. 76, p. 2032-2039, 1998.

BERGER, T. Proportion of males with lower fertility spermatozoa estimative from heterospermic insemination. *Theriogenology*, v. 43, p. 769-775, 1995.

BERGER, T.; DALLY, M. Do sire-ram interactions contribute significantly to fertility comparisons in heterospermic inseminations trials. *Theriogenology*, v. 56, p. 535-543, 2001.

CALEGARI, R.S. “Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*”

BHATT, G.N.; VYAS, K.K.; PUROHIT, S.K.; JATKAR, P.R. A note on the comparative electroforetic pattern of seminal plasma of exotic and indigenous bulls. *Indian Journal Animal Science*, v. 49, p. 224-226, 1979.

BIANCHI, I.; COLLARES, T.; CAMPOS, V.P.; CAVALCANTI, P.V.; KAEFER, C.; CORRÊA, E.K.; DELLAGOSTIN, O.A.; LUCIA JÚNIOR, T.; DESCHAMPS, J.C.; CORREA, M.N. Fator do plasma seminal associado à integridade de membrana de espermatozóides suínos pós-descongelamento. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, p. 384-388, 2008.

BUEL, J.R. A method for freezing stallion semen and test of its fertility. *Vet. Rec.*, v. 75, p. 900-902, 1963.

BÓ, G.; CUTAIA, L.; CHESTA, P.; BALLA, E.; PICINATO, D.; PERES, L.; MARANÃ, D.; AVILÉS, M.; MENCHACA, A.; VENERANDA, G.; BARUSELLI, P. Implementación de programas de inseminación artificial em rodeos de cria de Argentina. IN: SIMPÓSIO INTERNATIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2, 2005, Londrina. Anais...Londrina, Brasil, 2005. p. 97-128.

BRAUDMEIER, A.G.; DEMERS, J.M.; SHANKS, R.D.; SAACKE, R.G.; MILLER, D.J. Examination of the binding ability of bovine spermatozoa to the zona pellucid as an indicator of fertility. *Journal of Andrology*, v. 23, p. 645-651, 2002.

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; PANICH, P.L.; JOHN, P.K. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*, v. 60, p. 1539-1551, 2003.

BYRD, W.; BRADSHAW, K.; CAR, B.; EDMAN, C.; ODOM, J. A prospective randomized study of pregnancy rates following intrauterine and cervical insemination using frozen donor semen. *Fertility Sterility*, v. 53, p. 521-527, 1990.

CALEGARI, R.S.; ROSSETO, M.R.; MARTINS Jr., A.; PASCHOAL, D.M. Método alternativo para determinação do volume do sêmen obtido de touros da raça Nelore. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 31., 2004, São Luis. Anais..... São Luis, 2004. p. 89.

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; MACHADO, G.M.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology*, v. 74, p. 1521-1530, 2010.

CASTRO, T.A.M.G.; MACHADO, C.E.P.; LIEPTIN, N.R. Níveis de proteína total e eletroforese das proteínas do plasma seminal de bovinos do Ecótipo Mantiqueira. *B. Industr. Anim.*, v. 43, p. 37-44, 1986.

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

CHANG, M.C. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature*, v. 179, p. 258-260, 1957.

CHASE, C.C.; LARSEN, R E.; HAMMOND, A.C. et al. Effect of dietary energy on growth and reproductive characteristics of Angus and Senepol bulls during summer in Florida. *Theriogenology*, v. 40(1), p. 43-61, 1993.

CALEGARI, R.S. “Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*”

- COETZEE, K.; KRUGER, T.F.; LOMBARD, C.J. et al. Assessment of inter and intra-laboratory sperm morphology readings using a Hamilton Thorne research IVOS semen analyser. *Fertility and Sterility*, v. 71, p. 1-5, 1999.
- COLLINS, E.D.; FLOWERS, W.L.; SHANKS, R.D.; MILLER, D.J. Porcine sperm-zona binding ability as an indicator of fertility. *Animal Reproduction Science*, v. 104, p. 69-82, 2008.
- COMIZZOLI, P.; MAUGET, R.; MERMILLOD, P. Assessment of in vitro fertility of deer spermatozoa on non return rate in preselected dairy bulls. *Theriogenology*, v. 56, p. 261-74, 1994.
- CONTI, 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. 424-335, aug. 2010.
- CORTEEL, J.M. Effects of seminal plasma on the survival and fertility of spermatozoa kept in vitro. *Reprod. Nutr. Develop.*, v. 20, p. 1111-1123, 1980.
- CROCKET, E.C.; GRAHAN, J.K.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Effect of cooling equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology*, v. 55, p. 793-803, 2002.
- DAVID, G.; SEVER, S.; JOUANNET, P. Kinematic of human spermatozoa. *Gamete Research*, v.4, p. 83-86, 1981.
- DAWSON, G.R.; WEBB, G.W.; PRUIT, J.A.; LOUGHLIN, T.M.; ARNS, M.J. Effect of different processing techniques on motility and acrosomal integrity of cold-stored stallion spermatozoa. *Journal Equine Veterinary Science*, v. 20, p. 191-194, 2000.
- DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DASS, J.H.G. Effects of various cryoprotectants agents and membrane stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v. 30, p. 32-34, 1993.
- DHALI, A.; ANCHAMPARUTHY, V.M.; BUTLER, S.P.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. *In vitro* development of bovine embryos culture with stem factor or insulin-like growth-factor I following IVF with semen of two bull having different field fertility. *Animal Reproduction Science*, v. 116, p. 188-95, 2009.
- DEN DASS, J.H.G.; JONG, G.; LANSBERGEN, L.M.T.E.; DE LEEUW, A.M. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 1714-1723, 1998.
- DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E. Glutathione and hypotaurine in vitro: Effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*, v. 15, p. 305-314, 2000.
- DOTT, H.M. Effects of bovine seminal plasma on the impedance change frequency and glycolysis of bovine epididymal spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 38, p. 147-156, 1974.
- DOTT, H.M.; FOSTER, G.C. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 55, p. 161-166, 1979.

- DZIUK, P.J. Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 43, p. 65-88, 1995.
- FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analyses (CASA) and relationship to fertility. *Theriogenology*, v. 49, p. 871-879, 1998.
- FETTERHOLF, P.M.; ROGERS, B.J. Prediction of human sperm penetrating ability using computerized motion parameters. *Molecular Reproduction Development*, v. 27, p. 326-331, 1990.
- FERREIRA, J.C.P.; NEVES NETO, J.R.; PAPA, F.O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 21, p. 131-132, 1997.
- FLINT, A.F.; CHAPMAN, P. L.; SEIDEL Jr., G.E. Fertility assessment through heterospermic insemination of flow-sorted sperm in cattle. *Journal Animal Science.*, v. 81, p.1814-1822, 2003.
- FLIPSE, R.J., ALMQUIST, J.O. Effect of total digestible nutrient intake from birth to four years of age on growth and reproductive development and performance of dairy bulls. *Journal Dairy Science*, v.44, p. 905-914, 1961.
- FOOTE, R.H. Artificial Insemination to cloning. Cornell University Resource Center, Ithaca, NY, 1998.
- FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, v. 71, p. 13-23, 2002.
- FOOTE, R.H. Fertility estimation: a review of past experience and futures prospects. *Animal Reproduction Science*, v. 75, p. 119-139, 2003.
- FRAPPELL, J.P.; WILLIAMS, G. A study of heterospermico insemination in cattle. Proc.III. Congre. *Animal Reproduction*. Cambridge, p. 65-67, 1956.
- FURSTOSS, V.; BORDERES, F.; FORGERIT, Y.; GUILLOUET, P.; LEBOEUF, B. The value of the percentage of motile sperm in predicting a significant portion of the fertility variation of frozen-thawed buck semen. *Theriogenology*, v. 74, p. 1197-1206, 2010.
- GADELA B.M.; COLENBRANDER B.; LOPES-CARDOSO M. Arylsufatases are present in seminal plasma of several domestic mammals. *Biology of Reproduction*, v.45, p. 381-386, 1991.
- GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; SUAREZ, S.S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction*, v. 69, p. 809-815, 2003.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ESTEO, M.C.; SOLER, A.J. Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, v. 71, p. 643-650, 2009.
- GARCIA, M.A.; GRAHAM, E.F. Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. *Cryobiology.*, v. 24, p. 446-454, 1987.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; ALLEN, C.H. Effect of sêmen dilution on bovine sperm viability as determined by dual-DNA staining and flow cytometry. *Journal Andrology*, v. 18, p. 324-331, 1997.

GERBER, D.; De HASS, K.; NÖTHLING, J.O. Effect of bovine seminal plasma on the ability off buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa to fertilize bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, v.59, p. 11-15, 2003.

GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; HAARD, M.C.; HAARD, M.G.M.; JOHANISSON, A; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus® and Triladyl®. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 35, p. 69-77, 2000.

GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of ram semem after cervical insemination. *Theriogenology*, v. 57, p. 1781-1792, 2002.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. Analysis of sperm cell viability, acrossomal integrity, and mitochondrial function using flow citometry. *Biology of Reproduction*, v.43, p. 55-64, 1990.

GUYTON, A.C. 1992. Funções reprodutivas e hormonais nos homens. In: *Tratado de fisiologia médica*. 8.ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.780-791.

HAFEZ, E.S E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal. 7 ed. Barueri: Manole, 2004. 509p.
HAFEZ, E.S.E. 1995. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: *Reprodução animal*. 6.ed. Tradução de Renato Campanarut Barnabe. São Paulo: Manole. p.59-94.

HEITLAND, A.V. et al. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*, v.28, p. 47-53, 1996.

HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. Effect of sperm preparation and bull fertility on in vitro penetration of zona-free bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 43, p. 739-749, 1995.

HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. *Journal Reproduction Fertility*, v. 2, p. 199-204, 1996.

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

HOFLACK, G.; OPSOMER, G.; MAES, D.; KRUIF, A. Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian and Holstein-Friesian bulls. *Reproduction Domestic Animal*, v. 42, p. 153-161, 2007.

HOLT, W.W.; VAN LOOK, K.J.W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, v. 127, p. 527-535, 2004.

IWAMOTO, T.; GAGNON, C. Purification and characterization of a sperm motility inhibitor in human seminal plasma. *Journal of Andrology*, v. 9, p. 377-383, 1988.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANISSON, A; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology*, v. 53, p. 859-875, 2000.

CALEGARI, R.S. “Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*”

JASCO, D.J.; MORAN, D.M.; FARLIM, M.E.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*, v. 35, p. 1059-1067, 1991.

JASCO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SIMPER, W.D.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*, v. 37, p. 1241-1252, 1992.

JEULIN, C.; LEWIN, L.M.; CHEVRIER, C. Changes in flagellar movement of rat spermatozoa along the length of the epididymis: Manual and computer-aided image analysis. *Cell Motility Cytoskeleton*, v. 35, p. 147-161, 1996.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBERGO, C.G.; SOUZA, D.O.; WALD, V.B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R. C. Two-dimensional electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, v. 61, p.255-266, 2004.

JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Proteínas do plasma sêmenial relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino. *Rev. Bras. Reprod. Anim. Supl*, Belo Horizonte, n.6, p. 25-31, dez. Disponível em www.cbpa.org.br. 2009.

JOHANNISSON, A.; MORRELL, J.M.; THORÉN, J.; JÖNSSON, M. Colloidal centrifugation with Androcoll-E[™] prolongs stallions sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science*, v. 116, p. 119-128, 2009.

KATONGOLE, C.B.; NAFTOCIN, F.; SHORT, R.U. Relationship between blood levels of luteinizing hormone and testosterone in bull, and effects of sexual stimulation. *Journal Endocrinology*, v. 50(3), p. 457-466, 1971.

KATSKA, L.; RYNSKA, B.; SMORAG, Z. Effect of seminal plasma on the in vitro fertilizability of bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 44, p. 23-31, 1996.

KREYSING, U.; NAGAI, T.; NIENAMAN, H. Male-dependent variability of fertilization and embryo development in two bovine in vitro fertilization system and the effects of casein phosphopeptides (CPPs). *Reproduction Fertilization Development*, v. 9, p. 465-475, 1997.

KILLIAN, G.J. Fertility factors in seminal plasma. Proceedings of the 14th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction, 1992.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, v. 49, p. 1202-1207, 1993.

KURT, J.M.; AMBROSE, J.D.; RAJAMAHENDRAN, R.; Cleavage rate of bovine oocytes in vitro is affected by bulls but not sperm concentration. *Theriogenology*, v. 45, p. 257, 1996.

KRAUSE, W. The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. *International Journal of Andrology*, v.18, p.32-35. 1995.

LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v. 227, p. 680-684, 1970.

LANGLAIS, J.; ROBERTS, K.D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrossome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Research*, v. 12, p. 183-224, 1985.

CALEGARI, R.S. “Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*”

- LARSSON, B.L.; SALISBURY, G. W. The proteins of bovine seminal plasma. *Journal Biological Chemistry*, v. 206, p.741, 1954.
- LARSSON, B.; RODRÍGUES-MARTÍNEZ. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 327-336, 2000.
- LEN, J.A.; JENKINS, J.A.; EILTS, B.E.; PACCAMONTI, D.L.; LYLE, S.K.; HOSGOOD, G. Centrifugation has minimal effects on motility, viability, and acrosome integrity of equine sperm. *Theriogenology*, v. 70, p. 576-591, 2008.
- LONERGAN, P. The application of in vitro fertilization techniques to the prediction of bull fertility. *Reproduction Animal Science*, v. 29, p. 12-21, 1994.
- LOWMAN, B.G.; SCOTT, N.A.; SCOTT, P.R. Na evaluation of some breeding management options in beefo herds in the United Kingdom. *Veterinary Record*, v. 135, p. 9-12, 1994.
- LÓPEZ, A.R.; ENCALADA, SW. Efecto de la remoción parcial del plasma seminal sobre la congelabilidad del sêmen bovino. *Ver. Biom.*, v. 8, p. 21-25, 1997.
- LOPES, M.D.; CUNHA, I.C.N. Efeito da centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.6, n.1, p.104-109, 2009.
- MANJUNATH, P.; NAUE, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 1250-1258, 2002.
- MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v.49, p. 27-39, 1993.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, G. Male reproduction function and semen general features of the seminal plasma. 2 ed. New York: Springer-Veriag, 1981.
- MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: [http : www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acesso em 10/04/2011.
- MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. "Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization tests. *Reproduction Nutrition Development*, v. 30, p. 259-266, 1975
- MARSHBURN, P.B.; McLNTIRE, D.; CARR, B.R. BYRD, W. Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine inseminations. *Fertility and Sterility*, v. 58, p. 179-188, 1992.
- MARTIN, G.B., TJONDRONEGORO, S., BLACKBERRY, M.A. Effects of nutrition on testicular size and the concentrations of gonadotropins, testosterone and inhibin in plasma of mature male sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101(1):121-128, 1994.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation os stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 27, p. 47-51, 1979.
- MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FÉRNANDEZ-SANTOS, M.R.; ESTESO, M.C.; MONTORO, V. Mitochondrial activity forward scatter vary in necrotic, apoptotic and membrane intact spermatozoa subpopulations. *Reproduction Fertility and Development*, v. 20, p. 547-556, 2008.

MARTINS JÚNIOR, A. Polimorfismo genético-bioquímico das proteínas do sangue e do plasma seminal de touros doadores de sêmen. 1993. 190f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 1993.

MARTINS JR, A.; SILVA, C.; SOUZA, D.G.; CRESPILO, A.M.; CALEGARI, R.S.; CÂNDIDO, T. Freezability of dog spermatozoa cooled using different procedures. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 36 (supl 2), p. 544, 2008.

MARTINUS, R.D.; MOLAN, P.C.; SHANNON, P. Deleterious effect of seminal plasma in the cryopreservation of bovine spermatozoa. *New Zealand J. Agric. Res.*, v. 34, p. 281-285, 1991.

MATAVEIA, G.A.; TERBLANCHE, S.J.; NÖTHLING, J.O.; GERBER, D. Effect of heterologous seminal plasma and semen extenders on motility of frozen-thawed ram spermatozoa. *JL S. Afr. Vet. Ass.*, v. 81 (3), p. 139-142, 2010.

MATTOS, R.C.; JOBIN, M.I.M.; OBERST, E.R. et al. BSP A1/A2: A seminal plasma marker of high semen freezability. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION. Proceedings, 2004, p. 462.

MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G.; MORTIMER, S.T.; GILLIAN, L. Normal fertility in ewes after cervical inseminations with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction Fertility Development*, v. 11, p. 123-126, 1999.

McLEOD, J.; MACGEE, W.R. The semen of the thoroughbred. *Cornell Vet.*, v. 40, p. 233-248, 1950.

MENDOZA C.; CARRERAS, A.; MOOOS, L.; TESARIK, J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *pisum sativum* agglutinin. *Journal Reproduction Fertility*, v. 95, p. 755-763, 1992.

MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology Reproduction*, v. 42, p. 899-915, 1990.

MILLIGAN, M.P.; HARRIS, S.; DENNIS, K.J. Comparison of sperm velocity in fertile and infertile groups as measured by time-lapse photography. *Fertility Sterility*, v. 34, p. 509-551, 1980.

MOORE, H.D.M.; HIBBIT, K.C.S. The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. *Journal Reproduction Fertility*, v. 46, p. 71, 1976.

MORTIMER, S.T. A Critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction*. Update, v. 3, n.5, p. 403-439, 1997.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M.; Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, p. 1695-1706, 2001.

MOUSTAFA, A.R.; MESZAUROS, I. Interrelationship between the protein content of bovine seminal plasma and behavior of the spermatozoa after freezing-and-thawing. *Acta Vet. Acad. Sci. Hungarian.*, v. 28, p. 403-408, 1981.

MUINO, R.; RIVIERA, M.M.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GILO, J.E.; PENA, A.I. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Animal Reproduction Science*, v. 109, p. 50-64, 2008.

CALEGARI, R.S. “Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*”

- NAIB, A.; HANRAHAN, J.P.; LONERGAN, P.; FAIR, S. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. Disponível: www.sciencedirect.com *Theriogenology*, In press, 2011.
- NELSON, L.D.; PICKETT, B.W.; SEIDEL Jr., G.E. Effect of heterospermic insemination on fertility of cattle. *Journal Animal Science*, v. 40, p. 1124-1129, 1975.
- NELSON, L.D.; SEIDEL Jr., G.E.; PICKETT, B.W. Effect of the number of males contributing to a seminal mixture on fertility of rabbits. *Journal Animal Science*, v. 49, p. 1497-1500, 1979.
- NISHIKAWA, Y.; WAIDE, Y. Studies on the artificial insemination in horses. III. A new preservation method of the horse spermatozoa, so-called baken method. *Jap. J. Zootech. Sci.*, v. 20, p. 123-128, 1949.
- NOLAN, C.J.; NEUENDORFF, D.A.; GODFREY, R.W. et al. 1990. Influence of dietary energy intake on prepubertal development of brahman bulls. *Journal Animal Science*, v. 6(8), p. 1987, 1996.
- NÖTHLING, J.O.; SHUTTLEWORTH, R.; HAAS, K.; THOMPSON, P.N. Homologous prostatic fluid added to frozen-thawed dog spermatozoa prior to intravaginal of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. *Theriogenology*, v. 64, p. 975-991, 2005.
- NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORAN, J.M.; PÉÑA, F.J. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reproduction Animal Domestic*, v. 41, p. 527-535, 2004.
- OBA, E.; DELLAQUA Jr., J.A.; SOUSA, D.B.; PAPA, F.O.; BICUDO, S.D.; MACEDO, L.P. Influence of centrifugation and removal of seminal plasma in cryopreservation of ram semen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 2, n. 1, p. 481-481, 2004.
- ODONNELL, L.; McLACHLAN, R.I.; WREFORD, N.G.; ROBERTSON, D.M. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology*, v. 135(6), p. 2608-2614, 1994.
- O'HARA, L.; HANRAHAN, J.P.; RICHARDSON, L.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; EVANS, A.C.; LONERGAN, P. Effect of storage duration, store temperature, and diluents on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, v. 73, p. 541-549, 2010.
- OHGODA, O.; NIWA, K.; YURA, M.; TAKAHASHI, S.; KANOYA, K.; Variations in penetration rates in vitro of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. *Theriogenology*, v. 29, p. 1375-1381, 1988.
- OLLERO, M.; CEBRIAN-PEREZ, J.A.; MIIÑO-BLANCO, T. Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability addition of seminal plasma. *Journal Andrology*, v. 18, p. 732-739, 1997.
- OLIPHANT, G.; REYNOLDS, A.B.; THOMAS, T.S. Sperm surface components involved in control of the acrosome reaction. *Am. Journal Anatomy*, v. 74, p. 269-283, 1985.
- OLIVEIRA, E.C.S.; JULIANI, G.C.; MARQUES Jr., A.P. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, p. 1116-1122, 2006.

OLIVEIRA, C.H.; VASCONCELOS, A.B.; SOUZA, F.A.; MARTINS-FILHO, O.A.; SILVA, M.X.; VARAGO, F.C.; LAGARES, M.A. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 118, p. 194-200, 2010.

O'MEARA, C.M.; HANRAHAN, J.P.; PRATHALINGAM, N.S.; OWEN, J.S. Relationship between in vitro sperm functional testes and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v. 69, p. 513-522, 2008.

PAPA, F.O.; MARTINS, J.C.; KRAUSE, A.; KLUG, E. Influência da centrifugação sobre a motilidade do sêmen de equinos em resistência térmica e congelamento. *Revista Ciências Biomédicas*, v. 2, p. 31-39, 1981.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v. 38, p. 209-222, 1992.

PĚNA, F.J.; SARAIVA, F.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Detection of early changes in sperm membrane integrity pré-freezing can estimate post-thaw quality of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. , p. , 2006.

PERNOT, E.; SZUMOWSKI, P. Étude électrophoretique et immunoelectrophoretique des protéines du plasma seminal de taureau. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, v.40, n.11, p.1423-1434, 1958.

PICKETT, W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, W.W.; PACE, M.M.; REMMEGA, E.E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertil. Steril.*, v. 26, p. 167-174, 1975.

POLGE, C.; MINOTAKIS, C. Deep freezing of jackass and stallion semen. *Proc. Int. Anim. Reprod. Artif. Insem.*, v. 5, p. 545-552, 1964.

POST, T.B.; CHRISTENSEN, H.R. Testosterone variability and fertility in bulls. *Theriogenology*, v. 6., p. 615-616, 1976.

QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; RIGAU, A.T.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, v. 59, p. 1973-1990, 2003.

RATTAN, P.J.S.; RAO, M.B.; ANANTAKRISHNAN, C.P. Electrophoretic studies on bovine semen. *Indian Journal Animal Science*, v. 42, v. 77-84, p. 1972.

RIGBY, S.L.; BRINSKO, S.P.; COCHRAN, M.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Animal Reproduction Science*, v. 68, p. 171-180, 2001.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; KRUIF, A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 57, p. 1669-1681, 2002.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; ZHANG, B. R.; LARSSON, B. Bovine semen quality and the ability to produce embryos in vivo and in vitro. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v.25, (Suplemento), n. 1, p. 108-126, 1997.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Evaluation of frozen semen: tradicional and new approaches. International Veterinary Information Service, 2000. Disponível em [http: www.ivis.org](http://www.ivis.org). Acesso em 10/04/2011.

CALEGARI, R.S. "Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*"

- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction Animal Science*, v. 38, p. 312-318, 2003.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use increase the estimate value of semen assessment? *Reproduction Animal Science*, v. 41, p.2-10, 2006.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. State of the art in farm animal evaluation. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, p. 91-101, 2007.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; BARTH, A.D. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Society Reproduction Fertility*, v. 64, p. 34-59, 2007.
- RODGER, J.C. Seminal plasma an unnecessary evil? *Theriogenology*, v. 3, p. 237-239, 1975.
- RONCOLLETTA, M.; FRANCESCHINI, P.H.; LIMA, V.F.M.H.; RODRIGUES, L.H.; OLIVEIRA, M. A.; SILVA, C. Perfil em SPS_PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça Gir. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 36, 1999.
- ROTA, A.; STROMB, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and tree extender on canine semen stored a 4°C. *Theriogenology*, v.44, p. 885-990, 1995.
- ROTA, A.; STRÓM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUES-MARTINEZ, H. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology*, v. 47, p. 1093-1101, 1997.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, J.L.; WILDT, D.E.; BUSH, L.M. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). *Biology Reproduction*, v. 58, p. 475-482, 1998.
- SAACKKE, R.G. Semen quality in relation to semen preservation. *Journal Dairy Science*, v. 66, p. 2635-2644, 2008.
- SAHNI, K.L; MOHAN, G. Effect of removal of plasma on preservation on bovine semen. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 60, p. 647-648, 1988.
- SAHNI, K.L. Inhibitory effect of seminal plasma on motility of bovine semen. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 60, p. 786-788, 1990.
- SANTOS, M.D.; TORRES, C.A.A.; MACHADO, G.V.; COSTA, D.S.; ANGULO, L.M. Concentração sérica de testosterona em touros Zebu. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, p. 738-744, 2000.
- SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 35-50, 2004.
- SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.2. SAS Institute Inc., Cary:NC, 2008.
- SATAKE, N.; ELLIOT, R.M.A.; WATSON, P.F.; WILLIAM, V.H. Sperm selection and competition in pigs may be mediate by the differential motility activation and suppression of sperm subpopulations within the oviduct. *Journal Biology*, v. 209, p. 15160-1572, 2006.
- SCHENEIDER, C.S.; ELLINGTON, J.E.; WRITE, R.W. Relationship between bull field fertility and in vitro embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. *Theriogenology*, v. 51, p. 1085-1098, 1999.

SEVERO, N.C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. *A Hora Veterinária*, v. 28, p. 36-39, 2009.

SCHÄFER-SOMI, S.; KLUGER, S.; KNAPP, E.; KLEIN, D.; AURICH, C. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*, v. 66, p. 173-182, 2006.

SHARMA, U.D.; MAHAJAN, S.C. Preservation of buffalo semen. 1. Effect of seminal plasma. *Indian Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, v. 31, p. 20-23, 1961

SHARARA, F.I.; ILLIONS, E. H.; CODDINGTON, C.C. Evaluation of the Tru-Trax cervical mucus penetration test in predicting fertilization and pregnancy rates in vitro-fertilization. *Human Reproduction*, v. 10, p. 1481-1485, 1995.

SHIVAJI, S.; BHARGAVA, P.M. Antifertility factors of mammalian seminal fluid. *Bioassays*, v. 7, p. 13-17, 1987.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v. 65, p. 958-978, 2006.

SINGH, D.M.; PANGAWKAR, G.R. HUNDAI, R.S. Studies on certain biochemical constituents of seminal plasma in exotic and crossbred bulls. *Indian Veterinarian Journal*, v. 66, p. 1112-1115, 1989.

STALHAMMAR, E.M.; JANSON, L.; PHILIPSSON, J.; The impact of sperm motility on non return rate in preselected dairy bulls. *Reproduction Nutr Dev*, v. 34, p. 37-45, 1994.

STEWART, D.L.; SPOONER, R.L.; BENNET, G.H.; BEAUTTY, R.A.; HANCOCK, J.L. A second experiment with heterospermic insemination in cattle. *Journal Reproduction and Fertility*, v. 36, p. 107-116, 1974.

STRADAIOLI, G.; SYLLA, L.; MONACI, M.; MAIORINO, M. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in Bull spermatozoa provides a unique marker in the quest for semen quality analysis. *Theriogenology*, v. 72, p. 91-98, 2009.

SUAREZ, S.S.; KATZ, D.F.; OWEN, D.H. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biology Reproduction*, v. 44, p. 375-381, 1991.

SUDANO, M.J.; CRESPILO, A.M.; FERNANDES, C.B.; MARTINS JÚNIOR, A.; PAPA, F.O.; RODRIGUES, J.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F. Use of bayesian interference to correlate *in vitro* embryo production and *in vivo* fertility in Zebu bulls.

SUKCHAREN, N.; KEITH, J.; IRVINE, D.S. Predicting the fertilizing potencial of human sperm suspensions *in vitro*: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. *Fertility Sterility*, v. 63, p. 1293-1300, 1995.

TANAJURA NETO, J.A.; MARTINS Jr. A.; CALEGARI, R.S.; SILVA, C.; CRESPILO, A.M. Effects of seminal plasma removal on spermatological motion and *in vitro* embryo production. *Reproduction and Biotechnology*, p.213, 2008.

TARDIF, A.L.; FARREL, P.B.; FOOTE, R.H. Computer-Assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 1606-1612, 1997.

CALEGARI, R.S. "Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*"

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictor of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 62, p. 1245-1252, 2004.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparision of Biociphos-plus and tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, v. 57, p. 1087-1094, 2002.

USDA, United States Department of Agriculture Disponível em:
<http://www.usdabrazil.org.br/home/about-usda-brazil.asp>

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

VESSELINOVITCH, S.D. Electrophoresis of bovine semen –part III characterization of the seminal plasma proteins. *Revista*, v. , p. ano.

VIANA, F. Correlação entre diferentes tipos de termorresistência e índices de fertilidade com sêmen congelado bovino. Botucatu, 2004. 100p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, M.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improves post-thaw motility and fertility os stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 54, p. 907-919, 2000.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIN, N.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Relationship between embryo development in vitro and 56 day non-return rates of cows inseminated with froze-thawed semen from dairy bulls. *Theriogenology*, v. 48, p. 221-231, 1997.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIN, N.; HÄÄRD, M.G.H.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. “Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme”, *International Journal of Andrology*, v. 22, pp. 253-260, 1999.

WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M.; LONERGAN, P.; Paternal influence on time of first embryonic clavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Molecular Reproduction Development*, v. 2001, p. 1575-1584, 2001.

WARD, F.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology*, v.59, p. 1575-1584, 2003.

WATERHOUSE, K.E.; GDELDNES, A.; TVERDAL, A.; De ANGELIS, P.M.; FARSTAD, M.; HAARD, M.; KOMMISRUUD, E. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and *in vitro* incubation of bull semen. *Animal Reproduction Science*, v.117, p. 34-42, 2010.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesement of their post thawing function. *Reproduction Fertililty and Development*, v. 7, p. 871-891, 1995.

WAY, A.L.; GRIEL Jr., L.C.; KILLIAN, G.J. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrossome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *Journal Andrology*, v. 21, n. 2, 2000.

CALEGARI, R.S. “Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*”

WHEELER, M. B. et al. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology*, v. 65, p. 219-227, 2006.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; NEILL, J.D. *The physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994, p. 189-317.

APENDICES

APÊNDICE - 1

Guide for Authors

Theriogenology (ISSN: 0093 – 691X)

Imprint: ELSEVIER

INTRODUCTION

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of Contribution

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Technical Notes

1. Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

2. Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

3. Technical Notes are concise, comprehensive descriptions of technical aspects of innovative methods (that will not be subsequently published as a full-length paper). The entire submitted manuscript typically should not exceed approximately 12 double-spaced pages.

Page Charges

CALEGARI, R.S. “Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*”

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>

Policy and Ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association \(Declaration of Helsinki\)](#) for experiments involving humans; [EC Directive 86/609/EEC for animal experiments](#); [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>

Submission Declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to Authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing

Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>) Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>

Retain Author Rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>

Role of the Funding Source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>

Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Sponsored Articles

This journal offers authors the option to sponsor non-subscriber access to their articles on

Elsevier's electronic publishing platforms. For more information please view our Sponsored Articles page at <http://www.elsevier.com/sponsoredarticles>

Language Services

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the online submission site of this journal (<http://ees.elsevier.com/therio/>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

Referees

Please submit, as part of the covering letter with the manuscript, the names, full affiliation (department, institution, city and country) and email addresses of up to 5 potential Referees. Appropriate Referees should be knowledgeable about the subject but have no close connection with any of the authors. In addition, Referees should be from institutions other than (and preferably countries other than) those of any of the Authors. You may also suggest reviewers you do not want to review your manuscript, but please state your reasons for doing so. The Editors retain the right to choose reviewers as deemed appropriate. All submissions will be reviewed by at least two anonymous reviewers to evaluate them for originality, clear statement of a hypothesis, appropriate experimental design, completeness of methods, a logical and comprehensive discussion, and conclusions that are supported by data.

PREPARATION

Language

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Use decimal points (not decimal commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Use of Word-processing Software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format and double spaced. It is important that all pages and lines are numbered. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the word processor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier:

<http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your word processor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsarticle", or alternatively the standard document class "article".

The Elsevier LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article Structure

Subdivision - Numbered Sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1. (then 1.1.1., 1.1.2., ...), 1.2., etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line, with one blank line above and below each heading.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. In most cases, this section should not exceed approximately 2 double-spaced pages.

Materials and Methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise, and should correspond to data collection as described in Materials and Methods.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential Title Page Information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was

CALEGARI, R.S. "Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*"

done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references

CALEGARI, R.S. "Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*"

and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: ➔ <http://www.iupac.org/> for further information.

Genbank

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** Note that in the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Math Formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Image Manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced.

Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic Artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions> **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line

drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your word processor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimized for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Non-Electronic Artwork

Provide all illustrations as high-quality printouts, suitable for reproduction (which may include reduction) without retouching. Number illustrations consecutively in the order in which they are referred to in the text. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. Clearly mark all illustrations on the back (or - in case of line drawings - on the lower front side) with the figure number and the author's name and, in cases of ambiguity, the correct orientation.

Mark the appropriate position of a figure in the article.

Color Artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color

figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure Captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text Graphics

Present incidental graphics not suitable for mention as figures, plates or schemes at the end of the article and number them "Graphic 1", etc. Their precise position in the text can then be indicated. See further under Electronic artwork. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left, but such embedding should not be done specifically for publishing purposes. Further, high-resolution graphics files must be provided separately.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice

CALEGARI, R.S. "Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*"

versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference Style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result..."

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Connor EE, Ashwell MS, Dahl GE. Characterization and expression of the bovine growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor. *Domest Anim Endocrinol* 2002;22:189-99.

Reference to a book:

[2] Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. *Principles of Laboratory Animal Science*, Revised Edition. Elsevier B.V., 2001.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Betteridge KJ. Embryo Transfer. In: *Reproduction in Domesticated Animals*, King GJ (Ed.), World Animal Science B9, Elsevier B.V., 1993, pp. 413-8.

CALEGARI, R.S. "Influência do sêmen homospérmico, heterospérmico e do plasma seminal heterólogo sobre os parâmetros espermáticos e produção de embriões bovinos *in vitro*"

Journal Abbreviations Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: ➡
<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: ➡
<http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): ➡
<http://www.cas.org/sent.html>.

Supplementary Material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: ➡
<http://www.sciencedirect.com> In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at
<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Additional Style Notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 µg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but do not do both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) until extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis until extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from the fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and figure and table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

AI	ANOVA	ADP	ATP	BSA
cAMP	CL	DEAE-cellulose	DMSO	DNA
eCG	EDTA	EGF	ELISA	FSH
GH	GnRH	hCG	HEPE	ShMG
IVC	IVF	IVM	LH	MOET
MSH	mRNA	NAD	NADH	PBS
PGF2 α	PGFM	PIPES	PRID	PRL
RIA	RNA	SDS-PAGE	SCNT	TRH
TRIS	tRNA	TSH		

Units of Measure:

cpm - counts per min

dpm - disintegrations per min

g - gram

ga - gauge of hypodermic needle

h - hour

kg - kilogram

L - liter

mL - milliliter

μ L - microliter

m - meter

min - minute

mo - month

sec - second

v:v - volume ratio

wk - week

wt/vol - weight per volume

yr - year

Routes of treatment:

id - intradermal

im - intramuscular

iu - intrauterine

iv - intravenous

sc - subcutaneous

po - oral

Statistical expressions:

ANOVA - analysis of variance

CV - coefficient of variation

df - degrees of freedom

F - variance ratio

NS - not significant

P - probability

SD - standard deviation

SEM - standard error of the mean

r - correlation coefficient

Additional information:

- For issues of style and format not addressed here, please consult Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the CBE Manual or a current English language collegiate-level dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions about the preparation of your manuscript.

Submission Checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at 

<http://epsupport.elsevier.com>

AFTER ACCEPTANCE*Use of the Digital Object Identifier*

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information.

The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address, then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>

Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>

<http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

Updated November 2010