

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA PARTIDA DE SÊMEN CONGELADO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE TOUROS
NELORE**

Heloisa Coelho Ferreira

Médica Veterinária

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA PARTIDA DE SÊMEN CONGELADO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE TOUROS
NELORE**

Discente: Heloisa Coelho Ferreira

Orientadora: Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Fabio Morato Monteiro

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Medicina
Veterinária, área: Reprodução Animal.**

F383e Ferreira, Heloisa Coelho
Efeito da partida de sêmen congelado sobre as características
espermáticas de touros Nelore. / Heloisa Coelho Ferreira. --
Jaboticabal, 2023
54 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Maria Emilia Franco Oliveira
Coorientadora: Fabio Morato Monteiro

1. Bovino. 2. Criopreservação. 3. Partida. 4. Sêmen. 5.
Termorresistência. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DA PARTIDA DE SÊMEN CONGELADO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE TOUROS NELORE

AUTORA: HELOISA COELHO FERREIRA

ORIENTADORA: MARIA EMÍLIA FRANCO OLIVEIRA

COORDENADOR: FÁBIO MORATO MONTEIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Medicina Veterinária,
área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente
MARIA EMÍLIA FRANCO OLIVEIRA
Data: 09/10/2023 05:34:06 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. MARIA EMÍLIA FRANCO OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodutiva e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. MÁIRA BIANCHI RODRIGUES ALVES (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente
MÁIRA BIANCHI RODRIGUES ALVES
Data: 09/10/2023 10:03:52 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. ANDRÉ MACIEL CRESPILO (Participação Virtual)
Universidade Santo Amaro (UNISA) / São Paulo/SP



Documento assinado digitalmente
ANDRÉ MACIEL CRESPILO
Data: 24/10/2023 12:17:53 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 06 de outubro de 2023

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Heloisa Coelho Ferreira, nascida no dia 17 de junho de 1998, no município de São Paulo - SP. É Médica Veterinária formada pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal - SP (2021). Foi bolsista de Iniciação Científica pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de 2018 a 2020, sob orientação da Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira. Realizou estágios durante a graduação na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (USP, Pirassununga - SP), na Embryoplus Brasil (Monte Mor - SP) e na Fazenda Santa Helena (Cáceres - MT), além dos estágios realizados na própria instituição. Na mesma instituição em que se graduou, ingressou no Mestrado (2021) em Medicina Veterinária, com ênfase em Reprodução Animal, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Agueda Helena Coelho Ferreira e Geraldino Agostinho Ferreira,
por serem meus exemplos de vida e por constantemente me apoiarem.

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de toda existência.

Aos meus pais, Agueda e Geraldino, à minha irmã, Geovana, e ao meu namorado, Marcos, que sempre me incentivaram com o maior amor.

À professora Dra. Maria Emilia Franco Oliveira, pela orientação, pelos ensinamentos transmitidos e pela amizade.

Aos professores Dr. Fabio Morato Monteiro e Dra. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante, por terem me auxiliado durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao agora médico veterinário, mas na época experimental graduando e bolsista de iniciação científica, Guilherme, pelo companheirismo, amizade e por toda a ajuda durante a fase experimental e após.

Aos pós-graduandos do Instituto de Zootecnia de Sertãozinho, Marcelo, Marina, Jaine e Letícia, pelos ensinamentos e companheirismo e Marcelo, também, por toda a ajuda com as análises estatísticas.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) e à Pós-Graduação em Medicina Veterinária Campus de Jaboticabal, pela oportunidade de realização deste curso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Congelação de sêmen	3
2.2 Determinação da qualidade do sêmen bovino	5
2.3 Análise Computadorizada do Sêmen (CASA)	7
2.4 Influência da motilidade na fertilidade espermática	9
2.5 Teste de Termorresistência.....	10
2.6 Teste Hiposmótico	12
3. REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2 – AS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS PODEM VARIAR ENTRE PARTIDAS DE SÊMEN CONGELADO DE TOUROS NELORE?	22
Resumo	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1 Amostras experimentais.....	24
2.2 Análise estatística	26
3. RESULTADOS	26
4. DISCUSSÃO.....	27
5. CONCLUSÃO	30
6. REFERÊNCIAS	31

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Protocolo nº 386-2023

Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Agricultura e Abastecimento
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto de Zootecnia

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado “EFEITO DA PARTIDA DE SÊMEN CONGELADO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE TOUROS NELORE”, PROTOCOLO Nº386-2023, sob a responsabilidade de Fabio Morato Monteiro, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante, Maria Emilia Franco Oliveira, Heloisa Coelho Ferreira, Marcelo Sant’Ana Borges, Guilherme Vechiato Benvenuto, que envolve a utilização de bovinos para fins de pesquisa científica e/ou treinamento – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO DE ZOOTECNIA, em reunião de 10/04/2023.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica ☐ Treinamento
Vigência do Projeto	10/04/2023 a 10/04/2024
Espécie/Linhagem	<i>Bos taurus indicus/ Nelore</i>
No. de Animais	04
Peso/Idade	acima de 400kg/ acima de 12 meses
Sexo	04 machos
Origem	Propriedade Particular

José Evandro de Moraes
Presidente CEUA-IZ

EFEITO DA PARTIDA DE SÊMEN CONGELADO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE TOUROS NELORE

Resumo: O estudo foi delineado para avaliar se há efeito de partida de sêmen congelado de touros Nelore sobre as características de cinética, morfologia e integridade de membrana plasmática dos espermatozoides antes e após períodos em sistema de incubação *in vitro* (teste de termorresistência, rápido [TTR/R] e lento [TTR/L]). Foram avaliadas oito partidas de sêmen oriundas de quatro touros da raça Nelore, totalizando 32 partidas de sêmen. Para cada partida, foram avaliadas sete palhetas de sêmen congelado, as quais foram destinadas à avaliação imediatamente após descongelação e em tempos de incubação no TTR/R à 46°C por 30, 45 e 60 minutos e no TTR/L à 38°C por 3, 5 e 8 horas. Foram avaliadas características da cinética espermática pelo sistema CASA, além da morfologia espermática e teste hiposmótico. Os efeitos de partida, tempo de incubação e sua interação foram analisados estatisticamente pelo SAS, sendo a significância declarada quando $P < 0,05$. A interação entre partida e tempo foi notada para as variáveis progressividade, linearidade e teste hiposmótico para o TTR/L. Efeito do tempo foi registrado para todas as variáveis analisadas, enquanto efeito da partida não foi significativo para nenhuma das variáveis. Uma possível explicação para a ausência de efeito de partida pode ser que as amostras seminais criopreservadas seguiram os padrões de qualidade estabelecidos por órgãos regulatórios, e que essas normas asseguram o similar potencial de fertilidade das mesmas. Em conclusão, de acordo com as condições do estudo, a partida de sêmen não exerce influência sobre as características de cinética, morfologia e de integridade de membrana plasmática das células espermáticas pós-descongelação de touros Nelore, submetidas ou não aos testes de termorresistência rápido e lento.

Palavras-chave: bovino, criopreservação, partida, sêmen, termorresistência.

EFFECT OF THE BATCH OF FROZEN SEMEN ON THE SPERM CHARACTERISTICS OF NELORE BULLS

Abstract: The study was designed to assess the effect of frozen semen batch of Nelore bulls on the kinetics, morphology and plasma membrane integrity of spermatozoa before and after periods in an *in vitro* incubation system (rapid [TTR/R] and slow [TTR/L] thermoresistance test). Eight semen batches from four Nelore bulls were evaluated, totaling 32 semen batches. Seven straws of frozen semen were evaluated for each batch. These were evaluated immediately after thawing and during incubation times in the TTR/R at 46°C for 30, 45 and 60 minutes and in the TTR/L at 38°C for 3, 5 and 8 hours. Sperm kinetics characteristics were evaluated using the CASA system, as well as sperm morphology and the hyposmotic test. The effects of batch, incubation time and their interaction were statistically analyzed using SAS, and significance was declared when $P < 0.05$. The interaction between batch and time was noted for the progressivity, linearity and hyposmotic test variables for TTR/L. The effect of time was recorded for all the variables analyzed, while the effect of the batch was not significant for any of the variables. A possible explanation for the absence of a batch effect could be that the cryopreserved seminal samples followed the quality standards established by regulatory bodies, and that these standards ensure their similar fertility potential. In conclusion, according to the conditions of the study, the semen batch has no influence on the kinetics, morphology and plasma membrane integrity characteristics of post-thawed sperm cells from Nelore bulls, whether or not they were subjected to the fast and slow heat resistance tests.

Keywords: batch, bovine, cryopreservation, semen, thermoresistance.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é o segundo maior do mundo, estimado em 196,47 milhões de cabeças no ano de 2021. O Brasil é o segundo maior produtor de carne bovina, representando 13,66% da produção mundial, e o maior exportador (ABIEC, 2022); isso faz com que a pecuária tenha uma grande importância econômica para o país, já que sua participação no PIB (Produto Interno Bruto) é relevante.

Associada ao aumento da demanda de alimentos está a tendência atual pela busca por qualidade, como a segurança alimentar, a responsabilidade social e a sustentabilidade (Vianna, 2005). Para que o objetivo seja alcançado e haja um aumento na produção com melhora da qualidade é necessária a eficiência máxima do sistema produtivo, que pode ser obtida pela melhoria genética dos rebanhos. Isso pode ser otimizado pela utilização de biotecnologias reprodutivas, como inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e transferência de embriões (TE) (Torres, 2016). Portanto, índices de produção elevados e eficiência reprodutiva alta são metas da atividade pecuária para que se tenha maior produtividade e custo-benefício (Cunha *et al.*, 2013).

Para a adoção da maioria das biotecnologias reprodutivas é comum o uso de sêmen congelado, e muitas vezes partidas oriundas de diferentes reprodutores. Caso a avaliação dessas partidas não seja corretamente realizada poderá haver grandes prejuízos econômicos por prejudicar a fertilidade das fêmeas (Arruda *et al.*, 2005). O próprio processo de criopreservação do sêmen causa danos físicos, químicos, ultraestruturais e/ou funcionais, sendo bastante prejudicial às células espermáticas (Curry, 2000; Medeiros, 2002). São vários os fatores que podem afetar a criotolerância, que é a capacidade da célula espermática de manter suas características vitais após a descongelação (Carmo, 2012). Entre esses fatores pode-se citar os diluidores, os crioprotetores, a curva de refrigeração, o sistema de criopreservação (Abud *et al.*, 2014), a quantidade de espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células mortas (Layek *et al.*, 2016), a espécie e o perfil genético do

animal (Holt, 2000), sua faixa etária e fatores ambientais e nutricionais (Assumpção, 2013).

Além disso, a criotolerância pode ser influenciada pelo caráter individual (Parkinson e Whitfield, 1987; Koivisto *et al.*, 2009) e variar a cada ejaculado de um mesmo indivíduo (Ryu *et al.*, 2019). Os touros podem ser classificados como doadores de sêmen de alta ou baixa congelabilidade e fatores, como a composição da membrana plasmática dos espermatozoides e substâncias integrantes do plasma seminal, podem explicar essa individualidade em relação à criopreservação (Garcia *et al.*, 2011; Alvarez *et al.*, 2008). Relatos de variação de qualidade seminal entre partidas de um mesmo touro não são tão frequentes, e a indicação do efeito de partida do sêmen bovino parece ser contraditória, pois alguns autores reportaram haver o efeito de partida (Martini *et al.*, 2022; Andrade *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2014; Thomé, 2013; Vincent *et al.*, 2012), enquanto outros não (Anderson *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1999).

A prévia identificação de touros que produzem sêmen com alta ou baixa criotolerância visa maximizar o uso de touros com sêmen de maior qualidade (Carmo, 2012), otimizar a quantidade de células espermáticas por palheta e reduzir o descarte de material pós congelação/descongelação pela qualidade inferior (Amann e Katz, 2004). Da mesma forma, a elucidação da existência ou não de efeitos de partida pode garantir os mesmos benefícios.

Tem-se observado uma limitação dos parâmetros considerados convencionais para avaliação seminal, como motilidade progressiva, morfologia e número de espermatozoides móveis, em relação à capacidade de predição da fertilidade. Por isso, estudos estão sendo ampliados com uso de testes complementares, como o teste hiposmótico e os testes de termorresistência (TTR) (Siqueira *et al.*, 2007). Além disso, uma ferramenta bastante utilizada é o *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA); um sistema automático que fornece informações precisas e acuradas do movimento espermático (Amann e Katz, 2004). O uso de diferentes ferramentas e testes complementares ao analisar as amostras seminais é bastante importante, pois permite avaliar o maior número possível de características espermáticas de modo a identificar o potencial de fertilidade de touros e partidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Congelação de sêmen

A criopreservação do sêmen é um procedimento muito utilizado a fim de incrementar o potencial reprodutivo de machos bovinos que possuem elevado valor genético, já que é essencial em biotécnicas reprodutivas, como inseminação artificial, produção *in vivo* e *in vitro* de embriões. A utilização de sêmen criopreservado permite escolher reprodutores que melhor se adequem às necessidades de produção de determinado rebanho e, com isso, permite também um avanço genético mais acelerado (Leite *et al.*, 2011).

O processo de criopreservação do sêmen começou a ser amplamente adotado na década de 1940, após a descoberta do glicerol e sua função crioprotetora (Ohashi, 2001). No entanto, a viabilidade dos espermatozoides pós descongelação depende de alguns fatores, como o diluidor utilizado, a curva de congelação, a forma de descongelação e a qualidade inicial do ejaculado (Amann e Pickett, 1987). De acordo com Watson (1995), com as técnicas de criopreservação, atinge-se em média 50% de viabilidade dos espermatozoides.

Os malefícios que a criopreservação causa nos espermatozoides se dão pela formação de cristais de gelo intra e extracelulares, pela própria alteração da temperatura e pela desidratação que ocorre dentro da célula espermática, que pode levar a alterações na membrana (Amann e Pickett, 1987). Além disso, elevadas concentrações de substâncias crioprotetoras podem causar um estresse tóxico e osmótico nos espermatozoides (Watson, 2000). Portanto, ao longo do processo de criopreservação do sêmen, as células espermáticas passam por estresse frequente que, conseqüentemente, prejudica os seus movimentos (Hammerstedt *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 2004; Arruda *et al.*, 2005; Celeghini *et al.*, 2017).

Portanto, apesar de ser rotineiro, o processo de criopreservação do sêmen ainda resulta em um número considerável de espermatozoides que não resistem ao procedimento, comprometendo o potencial fecundante da amostra seminal (Nagy *et al.*, 2004). Segundo Medeiros *et al.* (2002), ainda sob as melhores condições, além dos espermatozoides que não sobrevivem ao processo, mesmo os espermatozoides

sobreviventes podem apresentar mudanças que prejudicam a sua atividade funcional. Isso porque, durante o processo, as células espermáticas passam por etapas, como o resfriamento, congelação e descongelação, que são potencialmente prejudiciais às mesmas (Medeiros, 2002). E, além disso, durante essas etapas podem ocorrer diversos danos físicos, químicos, ultraestruturais e/ou funcionais (Curry, 2000), reduzindo a fertilidade do sêmen se comparado com o material *in natura*. Essa redução está associada à perda da viabilidade espermática e diminuição da motilidade dos espermatozoides que sobrevivem ao processo de criopreservação (Watson, 2000).

A criotolerância é a capacidade do espermatozoide de suportar o processo de criopreservação e, após a descongelação, manter suas características vitais (Carmo, 2012). Alguns fatores que afetam a criotolerância são a composição do meio diluidor, os crioprotetores, as taxas de congelação/dcongelação (Liu *et al.*, 1998), o sistema de criopreservação, convencional ou automatizado (Abud *et al.*, 2014) e a quantidade de espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células mortas (Layek *et al.*, 2016). Além disso, fatores ambientais, fatores nutricionais, a faixa etária (Assumpção, 2013), a espécie e o perfil genético do animal também afetam a criotolerância (Holt, 2000).

A criotolerância pode também ser afetada pelo caráter individual de cada touro (Parkinson e Whitfield, 1987; Koivisto *et al.*, 2009). Os reprodutores bovinos são classificados como sendo de alta ou baixa congelabilidade e própria composição da membrana plasmática e do plasma seminal são alguns fatores que podem explicar essa individualidade em relação à criopreservação (Garcia *et al.*, 2011; Alvarez *et al.*, 2008). Vários autores reportam diferenças entre os touros em relação ao sucesso na congelação e fertilidade do sêmen bovino (Kajaestad *et al.*, 1993; Stalhammar *et al.*, 1994; Roncoletta, 2003).

Além dos fatores já mencionados anteriormente, há relatos de variação de qualidade seminal entre partidas oriundas de um mesmo touro. A indicação do efeito de partida do sêmen bovino ainda é contraditória, sendo que alguns autores reportaram haver o efeito de partida (Martini *et al.*, 2022; Andrade *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2014; Thomé, 2013; Vincent *et al.*, 2012), da mesma forma com que Ryu *et al.* (2019) afirmam que a criotolerância pode variar a cada ejaculado, enquanto outros não (Anderson *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1999).

A prévia identificação de touros que produzem sêmen com alta ou baixa criotolerância, assim como partidas com maior ou menor potencial fertilidade, visa maximizar a utilização de touros ou partidas com sêmen de elevada qualidade (Carmo, 2012), otimizar a quantidade de células espermáticas por palheta, e reduzir o descarte de material pós congelação/descongelação pela qualidade inferior (Amann e Katz, 2004).

2.2 Determinação da qualidade do sêmen bovino

Para um espermatozoide ser classificado como viável e potencialmente fértil, é importante que se avalie diversos aspectos relacionados com o metabolismo celular, características de membranas plasmáticas e morfológicas (Arruda *et al.*, 2011). O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA, possui um Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal (CBRA, 2013), no qual há parâmetros e valores mínimos para que se possa considerar uma amostra de sêmen adequada para uso (Celeghini *et al.*, 2017). Algumas características do ejaculado que são avaliadas são o volume, cor, aspecto, turbilhonamento ou movimento de massa (classificação de 0-5), motilidade, vigor (classificação de 1-5), concentração e características morfológicas dos espermatozoides (CBRA, 2013).

Algumas análises, como a concentração espermática, a motilidade e a morfologia são usualmente realizadas (Arruda *et al.*, 2011). A concentração mostra o número de espermatozoides por unidade de volume e geralmente é obtida por meio da contagem dos espermatozoides na câmara de Neubauer, mas também pode ser utilizada a espectrofotometria, por exemplo (CBRA, 2013). A motilidade, expressa em porcentagem, representa o número de espermatozoides móveis (CBRA, 2013) e geralmente é estimada colocando-se uma gota de sêmen entre a lâmina e a lamínula e analisando sob microscopia óptica, de forma visual e, portanto, subjetiva (Arruda *et al.*, 2011).

A morfologia espermática é o estudo da anatomia da célula espermática (Arruda *et al.*, 2015) e também é realizada sob microscopia óptica, podendo ser feita, por exemplo, através de esfregaços corados. Alguns dos corantes utilizados são o Rosa de Bengala, eosina-nigrosina, Giemsa e Wright (Arruda *et al.*, 2011). Também

há outra técnica, a da câmera úmida, mas que não é usada com elevada frequência na rotina, pois requer o uso de microscopia de contraste de fase ou microscopia de contraste de interferência diferencial, DIC (CBRA, 1998; Johnson, 1997; Celeghini, 2005); equipamentos que conseguem destacar contornos celulares, já que os espermatozoides não são corados.

As anormalidades podem ser classificadas em defeitos de cabeça, peça intermediária ou cauda, de acordo com o local acometido, ou também em defeitos maiores e menores (Howard e Pace, 1988; CBRA, 1998). A classificação em defeitos maiores e menores foi sugerida por Blom (1972), que considerou as anormalidades relacionadas com prejuízos na fertilidade ou com alguma condição patológica no epidídimo ou testículo como sendo defeitos maiores e, conseqüentemente, as demais anormalidades, aparentemente de importância reduzida, foram classificadas como defeitos menores. Além disso, a presença de células epiteliais, neutrófilos, leucócitos, eritrócitos, bactérias e medusas deve ser considerada na hora de interpretar o resultado do espermograma (CBRA, 1998). Desde o início do século 20, observações vêm sendo feitas e publicadas a respeito da associação entre as alterações morfológicas das células espermáticas com a baixa fertilidade em machos bovinos e, desde então, a morfologia tem sido analisada (Williams, 1920; Williams e Savage, 1925; Lagerlöf, 1934, 1936). Segue, na Tabela 1, as características seminais desejáveis na espécie bovina para amostras *in natura* e pós descongelação.

Tabela 1. Características seminais desejáveis na espécie bovina para amostra *in natura* e congelada/descongelada.

CARACTERÍSTICAS	Sêmen <i>in natura</i> obtido por vagina artificial	Sêmen congelado/descongelado
Volume	5-8ML	-
Cor	Branca/amarelo marfim	-
Turbilhonamento	≥ 3	-
Motilidade	≥ 60%	≥ 30%
Vigor	≥ 3	≥ 3
Concentração espermática	~ 350x10 ⁶ /mL	-

Número total de sptz	3-5x10 ⁹ (ejaculado)	~ 10x10 ⁶ móveis (palheta)
Sptz morfologicamente normais	≥ 70%	≥ 70%
Defeitos maiores	≤ 10%	≤ 10%
Defeitos menores	≤ 20%	-
Defeitos individuais maiores	≤ 5%	-
Defeitos individuais menores	≤ 10%	-

Fonte: Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA, 2013).

As análises citadas, mesmo sendo realizadas por profissionais experientes, são subjetivas e apresentam elevada variação entre técnicos (Arruda *et al.*, 2011). Por esse motivo, a análise computadorizada do sêmen surgiu como alternativa para diminuir a subjetividade e aumentar a qualidade da avaliação do sêmen (Verstegen *et al.*, 2002; Nagy *et al.*, 2015).

2.3 Análise Computadorizada do Sêmen (CASA)

O *Computer Assisted Sperm Analysis* – CASA é um sistema automático que oferece informações precisas e acuradas do movimento de cada espermatozoide (Amann e Katz, 2004). Algumas análises, como motilidade, porcentagem de espermatozoides móveis e morfologia espermática são consideradas importantes na avaliação e seleção do ejaculado, no entanto, alguns estudos indicaram uma grande variação (30-60%) na aferição desses parâmetros de forma visual, ou seja, subjetiva (Amann e Hammerstedt, 1980; Verstegen *et al.*, 2002). Portanto, a análise computadorizada do sêmen surgiu a fim de reduzir essa subjetividade e fornecer informações precisas de cada célula espermática, assim como informações a respeito da população total de espermatozoides. Este tipo de análise teve início na década de 1970 e atualmente os aparelhos têm mostrado níveis de confiança e precisão elevados (Verstegen *et al.*, 2002).

Algumas vantagens da análise computadorizada do espermatozoide são a obtenção de forma objetiva de dados como motilidade, velocidade e morfologia (Kraemer *et al.*, 1998), a análise de um número elevado de espermatozoides, que apresentam um padrão de motilidade diferente entre si, de forma rápida (Mack *et al.*, 1988; Farrel *et al.*, 1996) e a possibilidade de armazenar as informações, tornando o trabalho mais versátil e confiável (Matos *et al.*, 2008). Por outro lado, algumas desvantagens são a necessidade de padronização das avaliações, como o ajuste do *setup* a ser utilizado, e o custo do equipamento, que torna difícil o seu uso em larga escala, principalmente quando se trata de centrais de pequeno porte (Davis e Katz, 1993).

O sistema CASA é formado por um microscópio de contraste de fase (negativo), que fica conectado à uma câmera de vídeo; esta reproduz as imagens para o computador com o software. O monitoramento dos espermatozoides é realizado por videomicrografia, sendo a cabeça a porção do espermatozoide que é inspecionada. Isso se deve ao fato de que a frequência dos batimentos dos flagelos, porção que dá origem à motilidade, é bastante elevada e os sistemas não são capazes de obter bons resultados de imagens (Mortimer, 2000; Amann e Katz, 2004). A segmentação, ou seja, a etapa automática de detecção dos espermatozoides, é realizada pela comparação de intensidade em relação a um limiar estabelecido previamente, e os limites mínimo e máximo de tamanho da cabeça são padronizados de acordo com cada espécie (Mortimer, 2000).

Para analisar a motilidade, as imagens que são obtidas pela câmera agregada ao microscópico são transformadas em imagens digitais e, depois, originam um filme (Donald *et al.*, 1988). O sistema reproduz, para cada espermatozoide, um desenho do movimento e classifica a trajetória como imóvel, móvel não progressivo, linear lento e linear rápido (Mortimer, 2000). Além da motilidade total e motilidade progressiva, outras variáveis são calculadas, como porcentagem de espermatozoides móveis, velocidade curvilinear (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) (Verstegen *et al.*, 2002). Com o uso do CASA, todas as células de um campo de visão são analisadas e suas trajetórias são refeitas antes que o campo seguinte

seja analisado (Donald *et al.*, 1988). Além disso, a morfologia espermática faz parte dos procedimentos para análise do sêmen e é capaz de indicar danos celulares (Verstegen *et al.*, 2002; Garcia-Herreros *et al.*, 2006) e, de acordo com Gravance *et al.* (1996), pode ser obtida pela análise computadorizada de sêmen para a espécie bovina.

O movimento vigoroso, não progressivo e não linear que o espermatozoide possui no oviduto da fêmea é denominado hiperativação e relaciona-se com a capacitação e a fecundação (Verstegen *et al.*, 2002). A monitoração desse processo, de forma objetiva, pode ser um biomarcador na predição da fertilidade (Kay e Robertson, 1998) e pode ser avaliado usando o CASA (Matos *et al.*, 2008). Verstegen *et al.* (2002) observaram que os parâmetros VAP, VCL e VSL são consideravelmente maiores em amostras de sêmen que produziram mais da metade de óocitos fertilizados. Além disso, Verstegen *et al.* (2002) e Mortimer (2000) relataram que amostras de sêmen com VAP, VCL, VSL, LIN e BCF elevados mostraram uma migração e penetração em muco cervical melhores. No entanto, há divergências entre os estudos e, de acordo com a maioria deles, VCL e ALH são os parâmetros com maior correlação com a fertilidade (Matos *et al.*, 2008).

2.4 Influência da motilidade na fertilidade espermática

A relação entre a qualidade seminal e a fertilidade é um dos pontos cruciais dentro de um sistema de produção (Januskauskas *et al.*, 2001). O processo de fertilização é complexo e o espermatozoide, além de chegar ao local de fertilização, deve penetrar o óocito e ativar o desenvolvimento embrionário para finalizar a sua função (Braundmeier; Miller, 2001). Isso requer vários atributos das células espermáticas (Arruda *et al.*, 2011). Um destes é a motilidade espermática, variável que representa o número de espermatozoides móveis (CBRA, 2013) e que indica a integridade e a viabilidade dos espermatozoides (Nagy *et al.*, 2015). É um parâmetro muito importante na avaliação seminal, tanto pré quanto pós congelamento/descongelamento (Rodrigues-Martínez, 2003), já que a motilidade é essencial para que o espermatozoide percorra o trato reprodutivo da fêmea até sua ligação com o óocito. Segundo Olds-Clarke (1996), o movimento espermático é um

dos parâmetros mais importantes relacionados ao potencial de fertilização, sendo relatada uma associação entre quadros de infertilidade com a ausência de movimento espermático.

Como já mencionado anteriormente, o processo de criopreservação do sêmen é potencialmente prejudicial à célula espermática, prejudicando os seus movimentos (Hammerstedt *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 2004; Arruda *et al.*, 2005; Celeghini *et al.*, 2017). Segundo Graham (1996), ocorre uma mudança irreversível caracterizada por perda de motilidade nos espermatozoides quando estes são submetidos ao choque térmico. E, de acordo com Martin *et al.* (2004), a redução da motilidade do espermatozoide se dá por distúrbios na produção de energia pelas mitocôndrias, fazendo com que haja diminuição do potencial de fertilização do oócito.

Diversos autores já estudaram a relação entre a motilidade, principalmente pós-descongelamento, do sêmen bovino com sua respectiva fertilidade. Alguns pesquisadores indicaram a existência de correlação entre os parâmetros, como Dimitropoulos (1967), Amann (1989), Farrell *et al.* (1998) e Nagy *et al.* (2015), enquanto alguns negam a existência de correlação, como Arruda *et al.* (1992), Zhang *et al.* (1999), Graham e Mocé (2005), Vianna *et al.* (2009), Emerick *et al.* (2011) e Sellem *et al.* (2015). Diversos autores (Graham e Mocé, 2005; Kastelic e Thundathil, 2008; Severo, 2009; Amman e Waberski, 2014; Sellem *et al.*, 2015) afirmaram que a avaliação de apenas um parâmetro, seja a morfologia ou a motilidade espermática, não é capaz de definir, com precisão, a fertilidade de uma partida de sêmen. Com isso, afirmaram que é imprescindível a realização de mais estudos a fim de estabelecer a correlação entre os parâmetros avaliados no laboratório, ou seja, *in vitro*, com a fertilidade do sêmen de bovinos (Amman, 1989; Amman e Waberski, 2014; Sellem *et al.*, 2015).

2.5 Teste de Termorresistência

O teste de termorresistência (TTR) averigua a resistência dos espermatozoides durante a incubação por meio da análise da motilidade (Borges-Silva *et al.*, 2015). O TTR faz parte da avaliação do sêmen pós descongelamento (CBRA, 1998) e foi apontado para analisar a fertilidade potencial do sêmen bovino congelado,

sendo depois ajustado para outras espécies (Siqueira *et al.*, 2007). Este teste teve grande aceitação, já que a incubação do sêmen em banho-maria por um determinado tempo mimetizaria as condições em que o mesmo fica exposto no trato reprodutivo das fêmeas em cio (Arruda *et al.*, 1992).

Para a realização do TTR, primeiramente as palhetas são retiradas do nitrogênio líquido e são descongeladas em banho-maria a 37-38°C por 15 (Arruda *et al.*, 1992), 20 (Siqueira *et al.*, 2007) ou 30 segundos (Vianna *et al.*, 2009). No teste de termorresistência lento (TTR/L), descrito primeiramente por Dimitropoulos (1967), a amostra é incubada em um tubo de ensaio ou eppendorf® em banho-maria a 38°C por 5 horas e, após esse período, a motilidade espermática progressiva é avaliada. O mesmo autor descreveu o teste de termorresistência rápido (TTR/R) com o objetivo de agilizar a análise pós descongelação, no qual a amostra é incubada em banho-maria a 46°C por 30 minutos, sendo a motilidade avaliada após esse período. Estes testes tiveram boa aceitação pela comunidade científica, já que o autor foi capaz de estabelecer uma relação positiva entre a motilidade pós TTR e a fertilidade a campo, medida pelo índice de não retorno ao estro aos 60 e 90 dias (Arruda *et al.*, 1992; Siqueira *et al.*, 2007).

Depois de Dimitropoulos, diversas técnicas já foram descritas, com alterações na temperatura e tempo de incubação das amostras. Para tempos maiores de incubação (3-28 horas), geralmente são utilizadas temperaturas mais baixas. No entanto, para tempos menores de incubação (15-60 minutos), são usadas temperaturas mais altas (Arruda, 1988). Muitos trabalhos mostraram diferentes formas de realizar o TTR com o intuito de correlacionar com a fertilidade a campo. Tanto Dimitropoulos (1967) quanto Vianna *et al.* (2009) usaram os TTR já mencionados: 38°C por 5 horas (teste lento) e 46°C por 30 minutos (teste rápido). Por outro lado, Arruda *et al.* (1992) utilizaram o mesmo teste lento, mas realizaram o teste rápido a 45°C por 30 minutos. Já Sellem *et al.* (2015) incubaram as amostras a 37°C por 4 horas e Siqueira *et al.* (2007) por 3 horas, na mesma temperatura.

A motilidade pós TTR é considerada um parâmetro eliminatório, importante para estabelecer a qualidade do sêmen e, assim, permitir ou impedir sua venda. De acordo com o CBRA (1998), para que uma amostra de sêmen bovino possa ser considerada de boa qualidade e comercializada, esta deve apresentar 15%, no

mínimo, de motilidade após o teste. Jondet e Rabadeux (1974) comunicaram que usam o TTRL há anos e que descartam toda amostra de sêmen que não apresenta 20%, no mínimo, de motilidade após o teste. Os autores também relataram que a diferença na queda percentual da motilidade é menor quanto melhor a classificação inicial da amostra (logo após a descongelação). A adoção do TTR apresenta a vantagem de poder reter amostras que seriam eliminadas pela avaliação convencional, por possuírem motilidade menor que 60% pós descongelação, e eliminar amostras que seriam comercializadas pela avaliação convencional, mas que não foram satisfatórias ao TTR. O objetivo, segundo Amann (1989), é poder determinar a fertilidade de uma partida de sêmen por meio de testes laboratoriais.

2.6 Teste Hiposmótico

O teste hiposmótico tem por objetivo avaliar a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides, o que é de suma importância para a capacitação espermática, reação acrossômica e fusão com o oócito (Jeyendran *et al.*, 1984). Por isso, espera-se que quanto maior o número de espermatozoides com a membrana plasmática funcionalmente ativa, melhor seja a qualidade do sêmen (Nie e Wenzel, 2001).

O teste se dá pelo princípio do transporte de fluidos por meio da membrana plasmática, em um meio hiposmótico, até que se atinja o equilíbrio entre os compartimentos. Com isso, haverá influxo de fluido para dentro do espermatozoide, principalmente na região da cauda e, conseqüentemente, o enrolamento das fibras da cauda, o que pode ser avaliado em microscópio de contraste de fase (Siqueira, 2004). Os espermatozoides com a cauda enrolada (“inchados”) são considerados como células com a membrana plasmática intacta (Drevius, 1972; Jeyendran *et al.*, 1984; Inamassu *et al.*, 1999).

Além de ser de baixo custo, o teste hiposmótico é bastante aplicável junto aos exames convencionais do sêmen a fim de se avaliar a fertilidade potencial e possíveis danos na membrana plasmática causados pela criopreservação (Siqueira, 2004). No entanto, por avaliar somente a funcionalidade da membrana, Correa e Zavos (1994) preconizam o seu uso juntamente com as avaliações convencionais, já que a

membrana plasmática pode estar íntegra e mesmo assim espermatozoide apresentar outra anormalidade que irá prejudicar a fecundação.

A viabilidade dos espermatozoides é uma questão que possui vários fatores envolvidos, sendo alguns relacionados à própria célula, como o seu metabolismo e a integridade dos seus componentes estruturais. Além disso, é importante ressaltar que pode haver lesão na membrana da cabeça do espermatozoide, e a membrana da cauda estar íntegra (células móveis, mas que não irão penetrar no oócito), e vice-versa, já que são diferentes compartimentos (Siqueira, 2004). Por isso, diversos estudos vêm sendo realizados com o emprego de diferentes testes *in vitro* a fim de verificar o grau de associação entre a integridade da membrana plasmática da cabeça das células espermáticas (observada por testes de coloração de exclusão e fluorescência) e a funcionalidade da membrana da cauda (observada pelo teste hiposmótico). Além disso, estes estudos também visam relacionar os resultados com os testes convencionais de avaliação seminal (Ericson *et al.*, 1993; Soderquist *et al.*, 1997; Melo, 1999; Santos, 2003; Borges, 2003; Snoeck, 2003).

3. REFERÊNCIAS

ABUD, C.O.G., ABUD, L.J., OLIVEIRA NETO, J.C., DODE, M.A.N., SERENO, J.R.B., MARTINS, C.F. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. **Ciência Animal Brasileira**, 15, 32-37, 2014.

ALVAREZ, J.G., STOREY, B. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal Andrology**, 13 (n.3), 232-241, 2008.

AMANN, R.P., HAMMERSTEDT, R.H. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. **Biology Reproduction**, 23 (n.3), 647-656, 1980.

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine of Veterinary Science**, 7-3, 145-173, 1987.

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

AMANN, R., KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, 25, 317-325, 2004.

AMANN, R.P., WABERSKI, D. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA): capabilities and potential developments. **Theriogenology**, 81, 5-17, 2014.

ANDRADE, J.D.S., MOREIRA, E.M., DA SILVA, G.M., DE SOUZA, V.L., NUNES, V.R.R., DE OLIVEIRA JÚNIOR, J.S., PFEIFER, L.F.M. Aspectos uterinos, foliculares e seminais que afetam a IATF em vacas de corte no período pós-parto. **Anais da Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 42 (n.3-4), 2018.

ANDERSON, S., HARKNESS, W., AKIN, Y., KAPROTH, M., KILLIAN, G. Categorical data analysis of the effect on bull fertility, of butylated hydroxytoluene addition to semen, extenders prior to freezing. **Journal of Dairy Science**, 77 (n.8), 2302-2307, 1994.

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

ARRUDA, R.P., BARNABE, V.H., ALENCAR, M.M. DE, BARNABE, R.C. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termoresistência: efeitos sobre a fertilidade. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 1, 131-137, 1992.

ARRUDA, R.P., CELEGHINI, E.C.C., ANDRADE, A.F.C., GARCIA, A.R., NASCIMENTO, J., RAPHAEL, C.F., SOUZA, L.W.O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TEFT. In: **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, Londrina, Anais Palestra: 166-179, 2005.

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

ARRUDA, R.P., CELEGHINI, E.C.C., GARCIA, A.R., DOS SANTOS, G.D.C., LEITE, T.G., OLIVEIRA, L.Z., LANÇONI, R., RODRIGUES, M.D.P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 47-60, 2015.

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes - ABIEC. Perfil da Pecuária no Brasil. 2022. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2022/>

Acesso em: 03 out 2022.

ASSUMPÇÃO, T.I. DE, YONEYAMA, K.A.G., PALLAORO, R., KITAGAWA, C., ALBERTON, C. Perfil de proteínas e açúcares do plasma seminal e sua relação com os parâmetros andrológicos de touros da raça Nelore. **Bioscience Journal**, 29, 940-945, 2013.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. In: **Symposium Internationale de Zootechnie**, 7, Milano, Italy, 1972.

BORGES, J.C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino**. 2003. 57p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, 2003.

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

BRAUNDMEIER A.G., MILLER D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, 84, 1915-1925, 2001.

CARMO, A.S. do. **Estudo de associação genômica e análise de enriquecimento genético da criotolerância espermática em bovinos da raça Nelore**. 2012. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/105890>>, 2012.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 49p, 1998.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013.

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

CELEGHINI, E.C.C., ARRUDA, R.P., FLOREZ-RODRIGUEZ, S.A., SANTOS, F.B., ALVES, M.B.R., OLIVEIRA, B.M.M. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 41, 40-45, 2017.

CORREA, J.R., ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as assay to frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, 42, 351-360, 1994.

CUNHA, R.R., FERNANDES, C.A.C., GARCIA, J.A.D., GIOSO, M.M. Inseminação artificial em tempo fixo em primíparas Nelore lactantes acíclicas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 65, 1041-1048, 2013.

CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, 5, 46-52, 2000.

DAVIS, R.O., KATZ, D.F. Operational standards for CASA instruments. **Journal of Andrology**, 14, 385-395, 1993.

DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé. **Animal Medicin Veterinary**, 4, 215-224, 1967.

DONALD, T.S., HICKMAN, R., HOSKINS, D.D. Description, validation and performance characteristic of a new computer-automated sperm motility analysis system. **Biology Reproduction**, 38, 577-586, 1988.

DREVIUS, L. The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of spermatozoa and sperm models. **Journal of Reproduction and Fertility**, 28, 41-54, 1972.

EMERICK, L.L., DIAS, J.C., VALE FILHO, V.R., SILVA, M.A., ANDRADE, V.J., LEITE, T.G., MARTINS, J.A.M. Avaliação da integridade de membrana em espermatozoide bovino criopreservado para prever o índice de prenhez. **Ciência Animal Brasileira**, 12, 536-546, 2011.

ERICSON, S.A., GARNER, D.L., THOMAS, C.A., DOWNING, T.W., MARSHALL, C.E. Interrelationship among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. **Theriogenology**, 39, 1009-1024, 1993.

FARREL, P.B., FOOTE, R.N., MCARDLE, M.M., TROUERN-TREND, V.L., TARDIF, A.L. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Andrology**, 17, 293-300, 1996.

FARRELL, P.B., PRESICCE, D.A., BROCKETT, C.C., FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer assisted semen analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, 49, 871-879, 1998.

GARCIA-HERREROS, M., APARICIO, I.M., BARON, F.J., GARCIA MARTIN, L.J., GIL, M.C. Standardization of samples preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, 29, 553-563, 2006.

GARCIA, B.M., FERNANDEZ, L.G., FERRUSOLA, C.O., BOLANOS, J.M.G., MARTINEZ, H.R., TAPIA, J.A., MORCUENDE, D., PENA, F.J. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, 75 (n.5), 811-818, 2011.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, 12, 131-147, 1996.

GRAHAM, J.K., MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, 64, 492-504, 2005.

GRAVANCE, C.G., LIU, I.K.M., DAVIS, R.O., HUGHES, J.P., CASEY, P.J. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, 108, 41-46, 1996.

HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, 11, 73-88, 1990.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of Species and individual differences. **Theriogenology**, 53, 47-58, 2000.

HOWARD, T.W., PACE, M.M. Seminal evaluations and artificial examination. **Fertility and infertility in veterinary practice**. 4ed., 39-51, 1988.

INAMASSU, A., VECHI, E., LOPES, M.D. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 23 (n.3), 302-304, 1999.

JANUSKAUSKAS, A., JOHANNISSON, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from swedish AI bulls. **Theriogenology**, 55, 947-981, 2001.

JEYENDRAN, R.S., VAN DER VER, H.H., PEREZ-PELAEZ, M., CRABO, B.G., ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to test the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, 70, 219-228, 1984.

JOHNSON, W. The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. **Veterinary Clinics of North America**, 13, 255-270, 1997.

JONDET, R., RABADEUX, Y. Utilisation du test de thermoresistance dans l'appréciation de la valeur du sperme congelé de taureau. In: **9th International Symposium of Zootechny**, Milano. Proceedings, Milano, 15-17, 1974.

KASTELIC, J.P., THUNDATHIL, J.C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, 43, 368-373, 2008.

KAY, V.J., ROBERTSON, L. Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological functions and application in assisted reproduction. **Human Reproduction**, 4, 776-786, 1998.

KJAESTAD, H., ROPSTAD, E., ANDERSEN, K.B. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 34, 299-303, 1993.

KOIVISTO, M.B., COSTA, M.T.A., PERRI, S.H.V., VICENTE, W.R.R. The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos Taurus* bulls in the southeastern region of Brazil. **Reproduction of Domestic Animals**, 44, 587-592, 2009.

KRAEMER, M., FILLION, C., MARTIN-PONT, B., AUGER, J. Factors influencing human sperm kinematic measuring by the celltrak computer-assisted sperm analysis system. **Human Reproduction**, 13, 611-619, 1998.

LAGERLÖF, N. Morphologische untersuchungen ueber veränderungen im spermabilt und in den hoden bei bullen mit verminderter oder aufgehobener fertilitat. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, 19, 1-254, 1934.

LAGERLÖF, N. Sterility in bulls. **Veterinary Record**, 41, 1159-1173, 1936.

LAYEK, S.S., MOHANTY, T.K., KUMARESAN, A., PARKS, J.E. Cryopreservation of bull semen: evolution from egg yolk based to soybean-based extenders. **Animal Reproduction Science**, 172, 1-9, 2016.

LEITE, P.A., SCHREDER, G.G., DE ALMEIDA, C.L.R., ZÚCCARI, C.E.S.N., DA COSTA, E.V. Criopreservação do sêmen bovino. **Journal of Health Sciences**, 13 (n.4), 2011.

LIU, Z., FOOTE, R.H., BROCKETT, C. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. **Cryobiology**, 37, 219-230, 1998.

MACK, S.O., WOLF, D.F., TASH, J.S. Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. **Biology of Reproduction**, 38, 270-281, 1988.

MARTIN, G., SABIDO, O., DURAND, P., LEVY, R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. **Biology of Reproduction**, 71, 28-37, 2004.

MARTINI, A.P., PESSOA, G.A., RUBIN, M.I.B. Conception rate according to sire, body condition score and estrus occurrence of suckled *Bos taurus* beef cows submitted to timed artificial insemination. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 74, 375-382, 2022.

MATOS, D.L., ARAÚJO, A.A., ROBERTO, I.G., TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 32 (n.4), 225-232, 2008.

MEDEIROS, C.M.O., FORELL, F., PLIEIRA, A.T.D., RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation. Why isn't it better? **Theriogenology**, 57, 327-344, 2002.

MELO, M.I.V. **Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino**. 1999. 67p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, 1999.

MORTIMER, S.T. Casa- Practical aspects. **Journal of Andrology**, 515-524, 2000.

NAGY, S., HALLAP, T., JOHANNISSON, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, 80, 225-235, 2004.

NAGY, A., POLICHRONOPOULOS, T., GÁSPÁRDY, A., SOLTÍ, L., CSEH, S. Correlation between bull fertility and sperm velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. **Acta Veterinaria Hungarica**, 63, 370-381, 2015.

NIE, G.J., WENZEL, J.G.W. Adaptation of the hypoosmotic test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. **Theriogenology**, 55, 1005-1018, 2001.

OHASHI, O.M. **Inseminação artificial de bubalinos**. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Livraria Varela, 97-110, 2001.

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

OLIVEIRA, B.M., ARRUDA, R.P., THOMÉ, H.E., MATURANA FILHO, M., OLIVEIRA, G., GUIMARÃES, C., CELEGHINI, E.C.C. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. **Theriogenology**, 82 (n.5), 767-772, 2014.

PARKINSON, T.J., WHITFIELD, C.H. Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. **Theriogenology**, 27, 781-797, 1987.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, 38, 312-318, 2003.

RONCOLETTA, M. **Perfil bidimensional de proteínas de membrana de espermatozóides e plasma seminal, relacionados com a fertilidade e com a congelabilidade do sêmen de touros**. 2003. 104p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2003.

RYU, D.Y., SONG, W.H., PANG, W.K., YOON, S.J., RAHMAN, M.S., PANG, M.G. Freezability biomarkers in bull epididymal spermatozoa. **Scientific Reports**, 9, 127-197, 2019.

SANTOS, G.C.J. **Viabilidade de sêmen equino congelado em meios diluidores de diferentes composições**. 2003. 58p. Dissertação (Mestrado em Medicina

Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, 2003.

SELLEM, E., BROEKHUIJSE, M.L.W.J., CHEVRIER, L., CAMUGLI, S., SCHMITT, E., SCHIBLER, L., KOENEN, E.P.C. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. **Theriogenology**, 84, 1447-1454, 2015.

SEVERO, N.C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. **Hora Vet**, 167, 36-39, 2009.

SIQUEIRA, J.B. **Relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com testes de avaliação espermática “in vitro”**. 2004. 91p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, 2004.

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

SNOECK, P.P.N. **Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade**. 2003. 116p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, 2003.

SODERQUIST, L., MADRID-BURY, N., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. **Theriogenology**, 48, 1115-1125, 1997.

STALHAMMAR, E.M., JANSON, L., PHILIPSSON, J. The impact of semen motility on non-return rate in preselected dairy bulls. **Reproduction Nutrition Development**, 34, 37-45, 1994.

THOMÉ, H.E. **Resposta inflamatória uterina em bovinos após inseminação artificial com sêmen avaliado por associações de sondas fluorescentes: efeitos sobre a fertilidade**. 2013. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 2013.

TORRES, J.R.S.J.R. Mitos e verdades em protocolos de IATF. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 40 (n.4), 129-141, 2016.

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

VIANNA, F.P. **Eficiência dos testes de termorresistência (lento e rápido) em relação a fertilidade de sêmen congelado na espécie bovina**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, 2005.

VIANNA, F.P., PAPA, F.O., ZAHN, F.S., MELO, C.M., DELL'AQUA, JR. J.A. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. **Animal Reproduction Science**, 113, 279-282, 2009.

VINCENT, P., UNDERWOOD, S.L., DOLBEC, C., BOUCHARD, N., KROETSCH, T., BLONDIN, P. Bovine semen quality control in artificial insemination centers. **Bovine reproduction**, 685-695, 2012.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment oh their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, 7, 871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, 60, 481-492, 2000.

WILLIAMS, W.W. Technique of collecting semen for laboratory examination with review of several diseased bulls. **Cornell Vet**, 10, 87-94, 1920.

WILLIAMS, W.W., SAVAGE, A. Observations on the seminal micropathology of bulls. **Cornell Vet**, 15, 353-375, 1925.

ZHANG, B.R., LARSSON, B., LUNDEHEIM, N., HAARD, M.G.H., RODRIGUEZ-MARTINEZ, 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**, 22, 253-260, 1999.

CAPÍTULO 2 - Artigo elaborado conforme as normas da revista *Animal Reproduction Science*

As características espermáticas podem variar entre partidas de sêmen congelado de touros Nelore?

Heloisa Coelho Ferreira¹, Marcelo Sant'Ana Borges², Guilherme Vechiato Benvenuto¹, Fábio Morato Monteiro², Maria Emilia Franco Oliveira^{*1}

¹ Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil

² Instituto de Zootecnia, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Bovinos de Corte, Sertãozinho, SP, Brasil

* Autor correspondente: mef.oliveira@unesp.br

Resumo

O macho bovino tem grande importância para a pecuária e as inseminações artificiais são majoritariamente realizadas com sêmen congelado. A indicação do efeito de partida do sêmen bovino ainda é contraditória, tampouco nenhum estudo encontrado teve como objetivo principal avaliar o efeito da partida. Assim, o estudo foi delineado para avaliar se há efeito de partida de sêmen congelado de touros Nelore sobre as características de cinética, morfologia e integridade de membrana plasmática dos espermatozoides antes e após períodos em sistema de incubação *in vitro* (teste de termorresistência rápido [TTR/R] e lento [TTR/L]). Foram avaliadas oito partidas de sêmen oriundas de cada um dos quatro touros da raça Nelore, totalizando 32 partidas de sêmen. Para cada partida, foram avaliadas sete palhetas de sêmen congelado, as quais foram destinadas à avaliação imediatamente após descongelação e em tempos de incubação no TTR/R à 46°C por 30, 45 e 60 minutos e no TTR/L à 38°C por 3, 5 e 8 horas. Foram avaliadas características da cinética espermática pelo sistema CASA, além da morfologia espermática e teste hiposmótico. Os efeitos de partida, tempo de incubação e possíveis interações foram analisados estatisticamente pelo SAS, sendo a significância declarada quando $P < 0,05$. Interações significativas foram observadas para as variáveis progressividade, linearidade e teste hiposmótico para o TTR/L. Efeito do período foi registrado para todas as variáveis analisadas, enquanto efeito da partida não foi significativo para nenhuma das variáveis. Uma possível explicação para a ausência de efeito de partida pode ser que as amostras seminais criopreservadas seguiram os padrões de qualidade estabelecidos por órgãos regulatórios, como o CBRA, e que essas normas asseguram o similar potencial de fertilidade das mesmas.

Em conclusão, de acordo com as condições do estudo, a partida de sêmen não exerce influência sobre as características de cinética, morfologia e de integridade de membrana plasmática das células espermáticas pós-descongelamento de touros Nelore, submetidas ou não aos testes de termorresistência rápido e lento.

Palavras-chave: partida, criopreservação, termorresistência, sêmen, bovino.

1. INTRODUÇÃO

O macho bovino tem grande importância para a pecuária já que, além de ser usado na monta natural de um número elevado de fêmeas, também gera milhares de doses de sêmen para serem usadas nas biotecnologias da reprodução (EMBRAPA, 2005). O rebanho brasileiro é o segundo maior do mundo, sendo o Brasil o segundo maior produtor e o maior exportador de carne bovina (ABIEC, 2022). De acordo com Baruselli (2022), houve um aumento de 20% no número de doses de sêmen comercializadas do ano de 2020 para 2021 e cerca de 93% das inseminações no país no ano de 2021 ocorreram por meio de IATF. O uso de inseminação artificial teve um grande crescimento, tendo como fator o emprego do uso da IATF (Baruselli, 2020), sendo que no ano de 2012, o uso da IA era de 9,65% e passou para 20,81 em 2022 (ASBIA, 2023).

As inseminações artificiais em bovinos são majoritariamente realizadas com sêmen descongelado, entretanto, a criopreservação envolve etapas potencialmente prejudiciais às células espermáticas (Medeiros, 2002). Danos físicos, químicos, ultraestruturais e/ou funcionais (Curry, 2000) levam à diminuição em até 50% do número de espermatozoides potencialmente férteis (Hallap et al., 2006). A criotolerância é a capacidade da célula espermática de suportar esse processo e manter suas características vitais após a descongelamento. São muitos os fatores que afetam a criotolerância (Carmo, 2012), como os diluidores, os crioprotetores, a curva de refrigeração, o sistema de criopreservação (convencional ou automatizado) (Abud et al., 2014), a quantidade de espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células mortas (Layek et al., 2016), a espécie, e o perfil genético do animal (Holt, 2000), a faixa etária e fatores ambientais e nutricionais (Assumpção, 2013).

Além dos fatores já mencionados, a criotolerância pode ser alterada pelo caráter individual (Parkinson e Whitfield, 1987; Koivisto et al., 2009) e variar a cada ejaculado (Ryu et al., 2019). Os touros podem ser classificados como de alta ou baixa

congelabilidade e fatores, como a própria composição da membrana plasmática das células espermáticas e de constituintes do plasma seminal, podem explicar essa individualidade em relação à criopreservação (Garcia et al., 2011; Alvarez et al., 2008). A prévia identificação de touros que produzem sêmen com alta ou baixa criotolerância visa maximizar a utilização de touros com sêmen de elevada qualidade (Carmo, 2012), otimizar a quantidade de células espermáticas por palheta, e reduzir o descarte de material pós congelação/descongelação pela qualidade inferior (Amann e Katz, 2004).

Relatos de variação de qualidade seminal entre partidas de um mesmo touro não são tão frequentes, e a indicação do efeito de partida do sêmen bovino parece ser contraditória, pois alguns autores reportaram o efeito de partida (Martini *et al.*, 2022; Andrade *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2014; Thomé, 2013; Vincent *et al.*, 2012), enquanto outros não (Anderson *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1999). Tampouco nenhum dos estudos mencionados tiveram como objetivo principal avaliar o efeito da partida.

Diante do exposto, a hipótese de presente estudo é que existe efeito de partida sobre as características espermáticas de sêmen congelado de touros Nelore. Assim, o presente estudo tem como objetivo determinar se há efeito de partida de sêmen congelado de touros Nelore submetidos a avaliações de sêmen pelo sistema CASA, teste hiposmótico e incubação *in vitro* em TTR rápido (TTR/R) e lento (TTR/L).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto experimental foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal pertencente ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Bovinos de Corte, unidade de pesquisa do Instituto de Zootecnia, localizada no município de Sertãozinho, SP, Brasil (21°10' latitude norte e 48°5' longitude oeste). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Zootecnia, sob o Protocolo n° 386-2023.

2.1 Amostras experimentais

Foram avaliadas oito partidas de sêmen congelado oriundas de quatro touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), totalizando 32 partidas de sêmen provenientes da mesma central comercial de produção de sêmen e foram produzidas seguindo as

mesmas técnicas de colheita e processamento do sêmen. Para cada uma das 32 partidas foram avaliadas sete amostras (palhetas).

As palhetas de sêmen congelado foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Após a descongelação, uma palheta foi avaliada imediatamente, sendo considerada controle (Tempo 0) e outras seis palhetas foram submetidas simultaneamente à incubação *in vitro*, sendo três para o TTR rápido (TTR/R) e três para o TTR lento (TTR/L). No Tempo 0 também foi analisada a morfologia espermática e, para isso, as amostras de sêmen foram acondicionadas e estocadas em 500 µL de solução formol salina tamponada e foram avaliadas ao microscópio Nikon (Eclipse Ni-U, Nikon®, Tóquio, Japão) com contraste diferencial de interferência de fase (DIC). Foi adotada a metodologia preconizada por Blom (1972), sendo contadas 200 células, registrando-se os defeitos de cabeça, peça intermediária, cauda e de acrossoma, com classificação das anomalias em defeitos espermáticos maiores, menores e totais (CBRA, 2013).

As amostras incubadas para o TTR/R foram mantidas em banho-maria a 46°C e avaliadas após 30, 45 e 60 minutos de incubação, enquanto para o TTR/L as amostras permaneceram em banho-maria a 38°C e foram avaliadas nos Tempos 3, 5 e 8 horas. O TTR analisa, por meio da motilidade, a resistência dos espermatozoides após um período de incubação (Borges-Silva et al., 2015), com o objetivo de estimar a fertilidade de uma partida de sêmen a partir de testes laboratoriais (Amann, 1989).

Todas as amostras em seus devidos tempos foram submetidas às análises dos parâmetros de cinética espermática utilizando a análise computadorizada da cinética espermática (CASA; Hamilton Thorne, Ivos 14, Beverly, MA, Estados Unidos), com o setup pré-ajustado para análise do sêmen bovino, conforme Anexo 1. Para tanto, o volume de 10 µL da amostra do sêmen foi depositado na câmara de Makler (SEFI Medical Instruments Ltda®, Haifa, Israel) previamente aquecida (38°C), sendo observados cinco campos microscópicos aleatórios e, no mínimo, 150 espermatozoides por campo. Os parâmetros utilizados foram: motilidade total (MT, %); motilidade progressiva (MP, %); porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP, %); velocidade média de trajeto (VAP, µm/s); velocidade em linha reta (VSL, µm/s); velocidade curvilinear (VCL, µm/s); amplitude de deslocamento lateral de cabeça

(ALH, μm); frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz); progressividade (STR, %); e linearidade (LIN, %).

No teste hiposmótico todas as amostras foram avaliadas quanto à integridade de membrana plasmática. Para isso, foi depositado 20 μL de sêmen em 1 mL de solução hiposmótica (100mOsm; Revell e Mrode, 1994) a 37°C durante 60 minutos. Após esse período, uma alíquota de 10 μL do sêmen diluído na solução hiposmótica foi colocada entre lâmina e lamínula e avaliada por microscopia de contraste de fase. Foram avaliados 200 espermatozoides em aumento de 400X quanto à presença ou não de cauda enrolada, sendo descontada a quantidade de caudas enroladas encontrada na análise morfológica. A porcentagem de espermatozoides viáveis foi calculada de acordo com Revell e Mrode (1994).

O teste hiposmótico avalia a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides, fundamental para a capacitação espermática, reação acrossômica e fusão com o oócito (Jeyendran et al., 1984).

2.2 Análise estatística

As análises foram realizadas com auxílio do programa “Statistical Analysis System” (SAS, 9.4 version, Inc., Cary, NC, US). Os resultados foram submetidos à análise de variância considerando medidas repetidas. Foi utilizado o procedimento MIXED para a análise de variância, ajustando o modelo com os efeitos fixos de partida ($i=1, \dots, 8$) e tempo de incubação do TTR/R ($j=0, \dots, 3$) ou TTR/L ($k=0, \dots, 3$). A variância residual foi modelada considerando a melhor estrutura de (co) variâncias de acordo com o Critério de Informação de Akaike, sendo CS (Compound Symmetry) considerado a estrutura mais adequada para o modelo. Foi ajustado para um modelo aninhado com a variável partida dentro de touro. As médias foram ajustadas pelo método dos quadrados mínimos (“LSMEANS”) e comparadas, quando necessário, por meio da probabilidade da diferença (“PDIF”). A significância estatística foi declarada quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Efeitos da interação entre partida e tempo foram notados ($p < 0,05$) para as variáveis, progressividade, linearidade e teste hiposmótico do TTR/L. Variações ao

longo do tempo ($p < 0,05$) foram observadas para todas as variáveis estudadas, enquanto o efeito da partida não foi identificado ($p > 0,05$) para nenhuma das variáveis.

Os resultados estão detalhados nas Figuras 1 - 6.

4. DISCUSSÃO

Apesar de o efeito da partida já ter sido apontado em alguns estudos, em todos ele foi tido como secundário ao objetivo principal. Além disso, há discrepâncias entre os trabalhos encontrados, sendo que alguns autores reportaram haver o efeito de partida (Vincent et al., 2012; Thomé, 2013; Oliveira et al., 2014; Andrade et al., 2018; Martini et al., 2022), enquanto outros não (Anderson et al., 1994; Zhang et al., 1999). Diante de nossas buscas, esse parece-nos ser o primeiro estudo focado em avaliar o efeito de partidas de sêmen congelado de touros por meio de uma série de análises computadorizadas, submetidas ou não a diferentes tempos e temperaturas de incubação para TTR. A hipótese inicial do presente estudo não foi confirmada, já que não foi identificado o efeito da partida sobre nenhuma das características espermáticas estudadas de sêmen congelado de touros Nelore.

A ausência do efeito de partidas de sêmen de um mesmo touro observada no presente estudo corrobora com Anderson et al. (1994) e Zhang et al. (1999). Anderson et al. (1994) não observaram alteração na fertilidade em partidas de um mesmo touro ao estudarem se a adição de um antioxidante afetaria ou não a fertilidade. Da mesma forma, em estudo realizado por Zhang et al. (1999), a fim de prever a fertilidade por meio de avaliações *in vitro* de sêmen de touros leiteiros, não houve efeito de partidas de um mesmo touro. A ausência do efeito de partida vista no presente estudo pode ser explicada pelo padrão de qualidade estabelecido na central comercial de produção de sêmen da qual as partidas eram provenientes. Isso possivelmente removeu a possibilidade de haver o efeito entre partidas diferentes de um mesmo touro.

Segundo a Instrução Normativa nº 53, de 27 de setembro de 2006 (Brasil, 2006), que discorre sobre o registro e fiscalização dos CCPS (Centros de Coleta e Processamento de Sêmen) bovino, o volume (mL), motilidade progressiva (%), vigor (escala de 0-5), defeitos maiores e totais (%) e número de espermatozoides por dose são informações que devem ser disponibilizadas aos compradores. Foi instituído o

Grupo de Trabalho de Andrologia Bovina pela Portaria n.109/2009 do Ministério da Agricultura e Pecuária (Brasil, 2009) a fim de rever o “Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal”, quando foram definidos os seguintes padrões para os ejaculados de touros: mínimo de 70% de espermatozoides normais, máximo de 20% de defeitos maiores (sendo o máximo de 5% de defeitos maiores individuais) e máximo de 30% de defeitos menores (sendo o máximo de 10% de defeitos menores individuais). A mesma Portaria instituiu o Grupo de Trabalho Técnicas de Avaliação Espermática em 2011, que indicou os padrões para uso de sêmen bovino convencional congelado: volume da dose 0,25 ou 0,50 mL, motilidade progressiva $\geq 30\%$, vigor ≥ 3 (descongelação a 35 a 37°C, por no mínimo 30 segundos), defeitos totais $\leq 30\%$ e defeitos maiores $\leq 20\%$ para doses com 10×10^6 de espermatozoides com motilidade progressiva e defeitos totais $\leq 20\%$ e defeitos maiores $\leq 10\%$ para doses com 6×10^6 a $< 10 \times 10^6$ de espermatozoides com motilidade progressiva. Em relação aos defeitos individuais, sugeriu-se o limite de 5% para defeitos maiores e 10% para defeitos menores.

Na Figura 1 pode-se notar que todas as partidas imediatamente após a descongelação (Tempo 0) apresentaram motilidade progressiva superior a 38%. Segundo Januskauskas e Zilinskas (2002), pode-se evitar a entrada de machos bovinos que possuem baixo potencial de fertilidade em programas de criopreservação seminal por meio da avaliação da morfologia, já que mudanças na morfologia estrutural dos espermatozoides estão relacionadas com sub e infertilidade (Saake et al., 1998, Pesh e Bergmann, 2006). No presente estudo os percentuais de defeitos de morfologia espermática estão dentro da normalidade (Figura 6), conforme os padrões estabelecidos pela Portaria n.109/2009 do Ministério da Agricultura e Pecuária (Brasil, 2009). Isto comprova a qualidade das amostras comercializadas pela central.

Como já mencionado, há trabalhos contraditórios acerca do efeito de partida, sendo que alguns autores observaram diferença de partida em relação às taxas de prenhez (Vincent et al., 2012; Thomé, 2013; Oliveira et al., 2014; Andrade et al., 2018; Martini et al., 2022). Martini et al. (2022) verificaram notável diferença na taxa de prenhez à IATF entre partidas de sêmen de um mesmo touro (1 = 58,5%, 2 = 62,5% e 3 = 83,2%). Da mesma forma, Oliveira et al. (2014) e Thomé (2013) evidenciaram a existência do efeito de partida ao estudarem células PIAIA (membrana plasmática e

acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial). Em ambos os estudos citados foram separadas as mesmas três partidas de sêmen de um mesmo touro, já aprovadas para comercialização, e foi observado que a partida com maior porcentagem de células PIAIA apresentou taxa de prenhez 28% maior do que o grupo com a menor porcentagem. Andrade et al. (2018), ao avaliarem touros com bons resultados na IATF, notaram que dois touros congelaram tanto partidas hiperativadas quanto não hiperativadas. Já Vincent et al. (2012) também evidenciaram a diferença entre partidas de um mesmo animal ao notarem que uma das partidas de um touro gerou poucos embriões pós FIV.

A diferença no potencial de fertilidade de diferentes partidas de sêmen de um mesmo touro encontrada nos estudos citados anteriormente que contradizem os resultados do presente trabalho pode ser relativa a parâmetros não avaliados nas análises convencionais do sêmen, que são as realizadas rotineiramente (Martini et al., 2022), podendo influenciar de forma significativa o resultado final do programa reprodutivo (Andrade et al., 2018). Os trabalhos de Oliveira et al. (2014) e Thomé (2013), por exemplo, demonstraram a consequente diferença na fertilidade observada a campo entre partidas de um mesmo touro que já haviam sido aprovadas para comercialização.

Esse parece-nos ser o primeiro estudo focado em avaliar o efeito de partidas por meio de uma série de análises computadorizadas e teste hiposmótico, submetidas ou não a diferentes tempos e temperaturas de incubação para TTR. Foram utilizados o TTR/R e TTR/L como forma de estudar como seria a longevidade dos espermatozoides e, principalmente, como forma de avaliar a presença ou ausência do efeito de partida. Ambos os testes são realizados com o objetivo de mimetizar *in vitro* o que ocorre naturalmente (*in vivo*), ou seja, o tempo de sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea, sendo que no TTR/R é feita uma aceleração deste processo pelo aumento da temperatura de incubação em relação à temperatura do corpo do animal. Efeito do tempo de incubação *in vitro* sobre todas as características espermáticas foi confirmado no presente estudo, corroborando com Siqueira (2004) trabalhou com TTR/L a 37°C, com incubações de uma, duas e três horas, e observou queda da motilidade ao longo do período de incubação. Esta pode ocorrer por lesões na cauda dos espermatozoides ou pela perda de componentes

intracelulares (Harrison e Vickers, 1990). Portanto, o fato de ter havido efeito do tempo de incubação sobre as características espermáticas já era esperado, já que as células espermáticas sofrem danos ao longo do tempo sob estas condições.

Alguns pesquisadores, como Vianna (2005) e Vianna et al. (2009), afirmaram que os TTR não possuem relação direta com a fertilidade e que são rígidos para as células espermáticas e, por isso, não são confiáveis ao prever o comportamento *in vivo* do sêmen criopreservado de touros. Por outro lado, Vincent et al. (2012) defendem a necessidade de um TTR com o objetivo de melhorar a precisão do controle de qualidade do sêmen e destacaram a importância de uma abordagem multiparamétrica e como ela pode aumentar a predição da fertilidade geral. Apesar de ser de comum acordo entre vários pesquisadores que quanto maior o número de características espermáticas estudadas, maior é a acurácia para identificar partidas com menor potencial de fertilidade (Celeghini et al., 2017), diante dos resultados encontrados no presente estudo, não vemos a necessidade de realizar muitas avaliações, já que os parâmetros realizados normalmente, como morfologia e motilidade espermática, foram suficientes a fim de garantir a ausência de diferenças entre as partidas, possivelmente pela manutenção do padrão de qualidade das amostras seminais. Portanto, é indispensável seguir os padrões de qualidade definidos para que a qualidade seminal final seja garantida dentro das centrais comerciais de produção de sêmen.

5. CONCLUSÃO

Não há efeito de partida para as características de cinética, morfologia e de integridade de membrana plasmática das células espermáticas pós-descongelamento de touros Nelore, submetidas ou não aos testes de termorresistência rápido e lento. Todas as características espermáticas avaliadas foram alteradas ao longo do tempo de incubação em ambos os testes de termorresistência.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Declaração de contribuição do autor

Todos os autores contribuíram para este artigo. HCF: coleta de dados e avaliações, metodologia, análise estatística e redação do manuscrito. MSB: análise estatística. GVB: coleta de dados e avaliações. FMM: metodologia, análise estatística e redação do manuscrito. MEFO: metodologia, análise estatística e redação do manuscrito.

Declaração de interesses concorrentes

Nenhum dos autores tem qualquer conflito de interesse a declarar.

6. REFERÊNCIAS

Abud, C.O.G., Abud, L.J., Oliveira Neto, J.C., Dode, M.A.N., Sereno, J.R.B., Martins, C.F., 2014. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. *Ciência Animal Brasileira*, 15, 32-37.

Alvarez, J.G., Storey, B., 2008. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Andrology*, 13 (n.3), 232-241.

Amann, R.P., 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?. *Journal of Andrology*, 10, 89-98.

Amann, R.P., Katz, D.F., 2004. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, 25, 317-325.

Anderson, S., Harkness, W., Akin, Y., Kaproth, M., Killian, G., 1994. Categorical data analysis of the effect on bull fertility, of butylated hydroxytoluene addition to semen, extenders prior to freezing. *Journal of Dairy Science*, 77 (n.8), 2302-2307.

Andrade, J.D.S., Moreira, E.M., da Silva, G.M., de Souza, V.L., Nunes, V.R.R., de Oliveira Júnior, J.S., Pfeifer, L.F.M., 2018. Aspectos uterinos, foliculares e seminais que afetam a IATF em vacas de corte no período pós-parto. *Anais da Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 42 (n.3-4).

ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Anuário ASBIA de genética bovina. Disponível em: <https://asbia.org.br/anuario-asbia/> Acesso em: 07 nov 2023.

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes - ABIEC, 2022. Perfil da Pecuária no Brasil. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2022/> Acesso em: 03 out 2022.

Assumpção, T.I., Yoneyama, K.A.G., Pallaoro, R., Kitagawa, C., Alberton, C, 2013. Perfil de proteínas e açúcares do plasma seminal e sua relação com os parâmetros andrológicos de touros da raça Nelore. Bioscience Journal, 29, 940-945.

Baruselli, P, 2020. Evolução da inseminação artificial em fêmeas bovinas de corte e de leite no Brasil. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra> Acesso em 05 de março de 2023.

Baruselli, P.S, 2022. IATF bate mais um recorde e supera 26 milhões de procedimentos em 2021. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra> Acesso em 14 de março de 2023.

Blom, E., 1972. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. In: Symposium Internationale de Zootechnie, 7, Milano, Italy.

Borges-Silva, J.C, Silva, M.R., Marinho, D.B., Nogueira, E., Sampaio, D.C., Oliveira, L.O.F., Abreu, U.G.P., Mourão, G.B., Sartori, R, 2015. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. Reproduction, Fertility and Development, 28 (n.7), 1004-1008.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa n° 53, 27 de setembro de 2006. Regulamento para registro e fiscalização de centro de coleta e processamento de sêmen (CCPS) bovino, bubalino, caprino e ovino. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 04 de out. 2006. Seq. 1.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Portaria n° 109, de 25 de maio de 2009. Institui Grupo de Trabalho no âmbito do Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários - DFIP/SDA, com a finalidade de atualizar o Manual de Procedimentos para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 maio 2009. Seq. 1, p.5.

Carmo, A.S. do, 2012. Estudo de associação genômica e análise de enriquecimento genético da criotolerância espermática em bovinos da raça Nelore. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/105890>>.

CBRA, 1998. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 49p.

CBRA, 2013. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal, 3 ed, Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 104p.

Celeghini, E.C.C., Arruda, R.D., Florez-Rodriguez, S.A., Santos, F.D., Alves, M.B.R., Oliveira, B.D, 2017. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 41 (n.1), 40-45.

Curry, M.R, 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, 5, 46-52.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. A importância do exame andrológico em bovinos, 2005. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/47256/1/Circular41.pdf> Acesso em 31 de janeiro de 2023.

Garcia, B.M., Fernandez, L.G., Ferrusola, C.O., Bolanos, J.M.G., Martinez, H.R., Tapia, J.A., Morcuende, D., Pena, F.J, 2011. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 75 (n.5), 811-818.

Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, U., Johannisson, A., Rodriguez Martinez, H, 2006. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. *Theriogenology*, 65, 1122-1136.

Harrison, R.A.P., Vickers, S.E, 1990. Use of fluorescent probes to access membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88, 343-352.

Holt, W.V., 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53, 47-58.

Januskauskas A., Zilinskas H., 2002. Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. *Vet Zootech*, 39, 1-8.

Jeyendran, R.S., Van Der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D., 1984. Development of an assay to asses the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70, 219-228.

Koivisto, M.B., Costa, M.T.A., Perri, S.H.V., Vicente, W.R.R., 2009. The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos Taurus* bulls in the southeastern region of Brazil. *Reproduction of Domestic Animals*, 44, 587-592.

Layek, S.S., Mohanty, T.K., Kumaresan, A., Parks, J.E., 2016. Cryopreservation of bull semen: evolution from egg yolk based to soybean-based extenders. *Animal Reproduction Science*, 172, 1-9.

Martini, A.P., Pessoa, G.A., Rubin, M.I.B., 2022. Conception rate according to sire, body condition score and estrus occurrence of suckled *Bos taurus* beef cows submitted

- to timed artificial insemination. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 74, 375-382.
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Plieira, A.T.D., Rodrigues, J.L., 2002. Current status of sperm cryopreservation. Why isn't it better? *Theriogenology*, 57, 327-344.
- Oliveira, B.M., Arruda, R.P., Thomé, H.E., Maturana Filho, M., Oliveira, G., Guimarães, C., Celeghini, E.C.C, 2014. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. *Theriogenology*, 82 (n.5), 767-772.
- Parkinson, T.J., Whitfield, C.H., 1987. Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 27, 781-797.
- Pesh, S., Bergmann, M., 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, 37, 597-612.
- Revell, S.G., Mrode, R.A., 1994. An osmotic resistance teste for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36, 77-86.
- Ryu, D.Y., Song, W.H., Pang, W.K., Yoon, S.J., Rahman, M.S., Pang, M.G, 2019. Freezability biomarkers in bull epididymal spermatozoa. *Scientific Reports*, 9, 127-197.
- Saacke, R.G., Dejarnette, J.M., Bame, J.H., Karabinus, D.S., Whitman, S.S., 1998. Can spermatozoa with abnormal heads gain acess to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulation cattle. *Theriogenology*, 50, 117-128.
- Siqueira, J.B., 2004. Relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com testes de avaliação espermática in vitro. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.
- Thomé, H.E., 2013. Resposta inflamatória uterina em bovinos após inseminação artificial com sêmen avaliado por associações de sondas fluorescentes: efeitos sobre a fertilidade. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Vianna, F.P., 2005. Eficiência dos testes de termorresistência (lento e rápido) em relação a fertilidade de sêmen congelado na espécie bovina. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista.
- Vianna, F.P., Papa, F.O., Zahn, F.S., Melo, C.M., Dell'Aqua Jr, J.A., 2009. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. *Animal Reproduction Science*, 113 (n.1-4), 279-282.
- Vincent, P., Underwood, S.L., Dolbec, C., Bouchard, N., Kroetsch, T., Blondin, P., 2012. Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Bovine reproduction*, 685-695.
- Zhang, B.R., Larsson, B., Lundeheim, N., Håård, M.G., Rodriguez-Martinez, H., 1999. 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* 22 (n. 4), 253-260.

Legenda das figuras:

Figura 1. Médias da motilidade total (A e B) e motilidade progressiva (C e D) de acordo com as partidas e tempos para os testes de termorresistência rápido (TTR/R) e lento (TTR/L), respectivamente, de amostras de sêmen criopreservadas de touros Nelore.

Figura 2. Médias da velocidade rápida (A e B), velocidade média de trajeto (VAP) (C e D), velocidade em linha reta (VSL) (E e F), e velocidade curvelinear (VCL) (G e H) de acordo com as partidas e tempos para os testes de termorresistência rápido (TTR/R) e lento (TTR/L), respectivamente.

Figura 3. Médias da amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) (A e B) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) (C e D) de acordo com as partidas e tempos para os testes de termorresistência rápido (TTR/R) e lento (TTR/L), respectivamente.

Figura 4. Médias da progressividade (STR) (A e B) e linearidade (LIN) (C e D) de acordo com as partidas e tempos para os testes de termorresistência rápido (TTR/R) e lento (TTR/L).

Figura 5. Médias do percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra pelo teste hiposmótico (A e B) de acordo com as partidas e tempos para os testes de termorresistência rápido (TTR/R) e lento (TTR/L).

Figura 6. Médias da morfologia espermática, considerando o percentual de defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais, logo após a descongelação.

Figura 1:

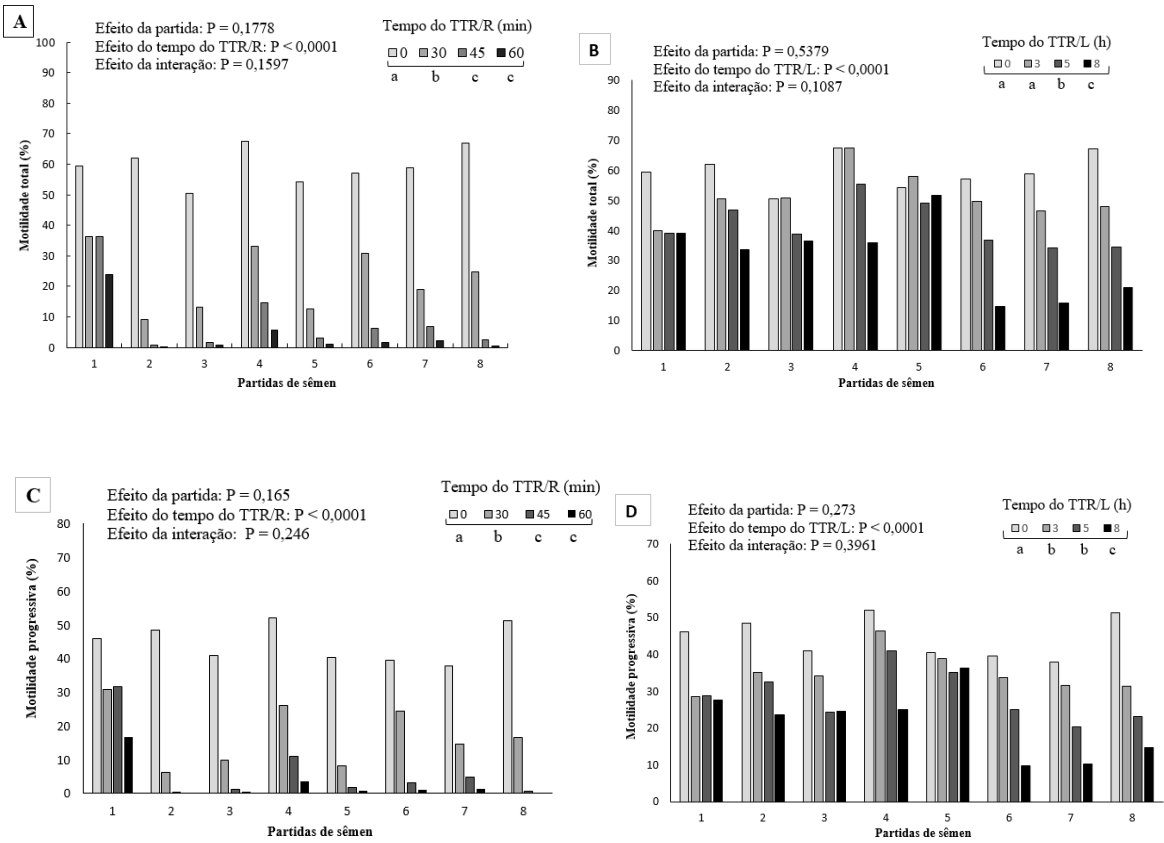


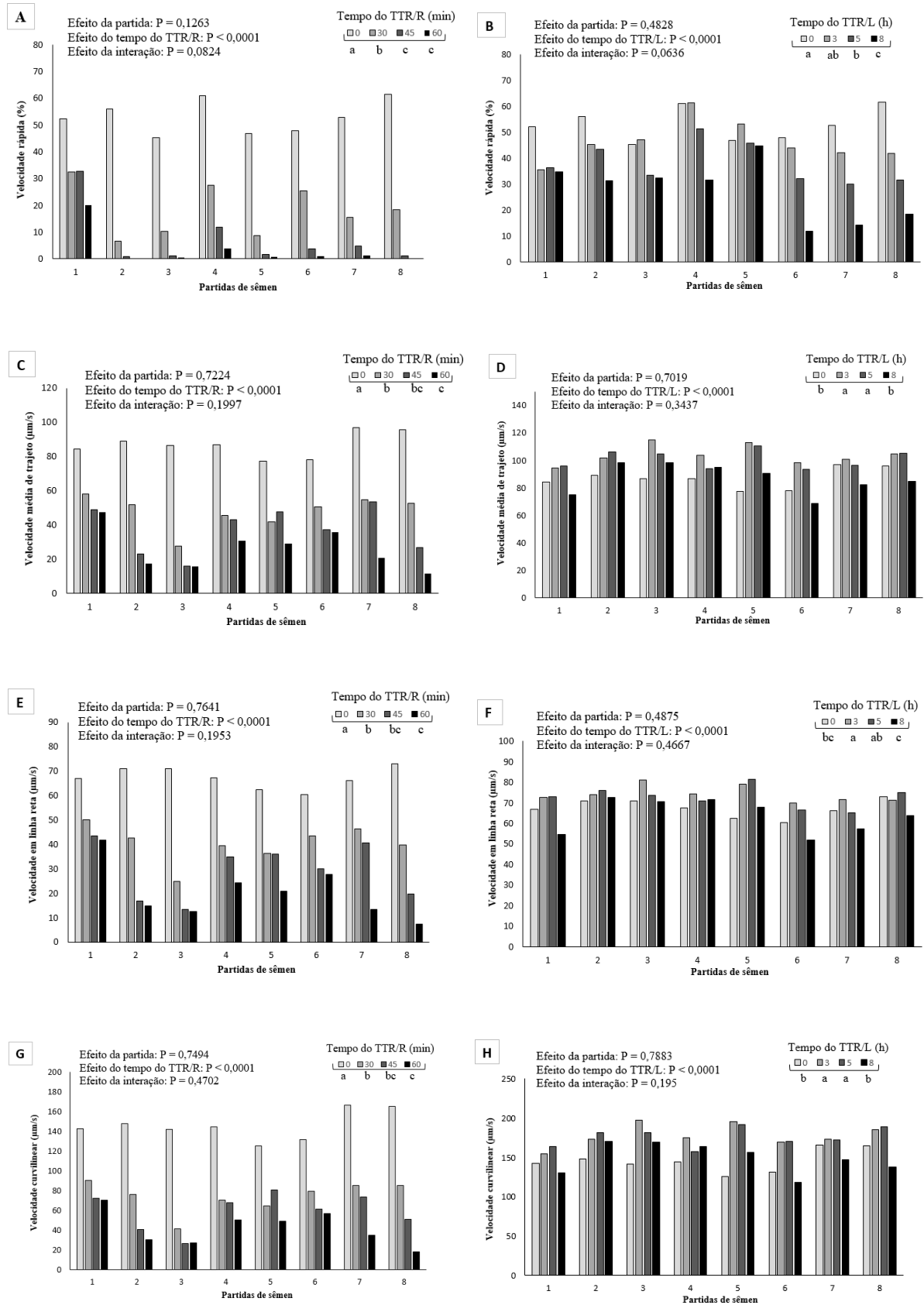
Figura 2:

Figura 3:

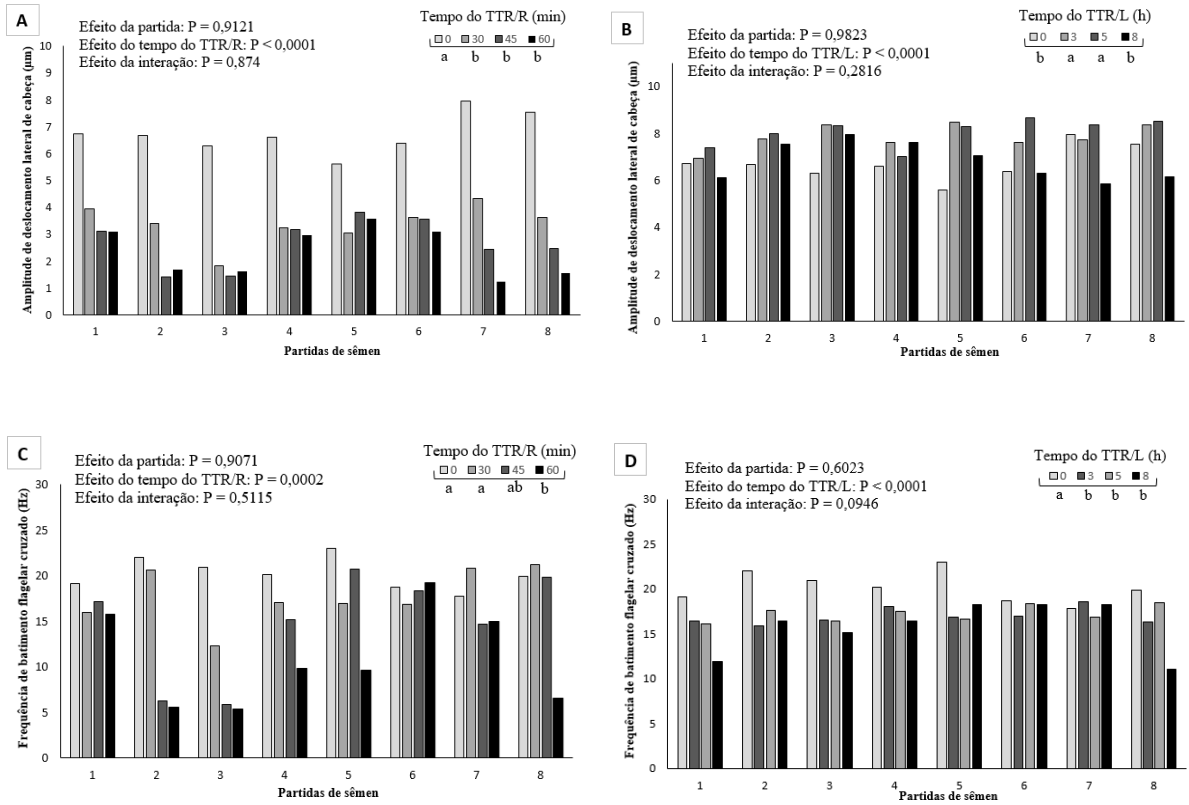


Figura 4:

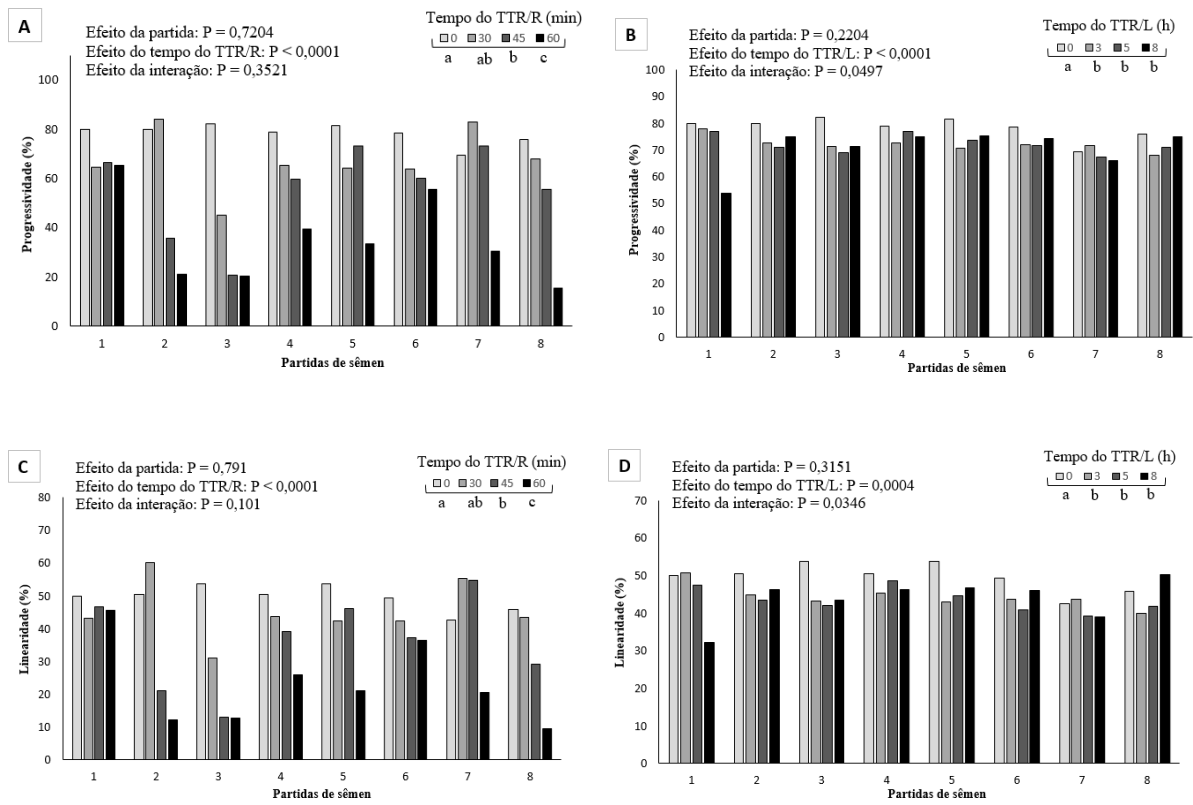


Figura 5:

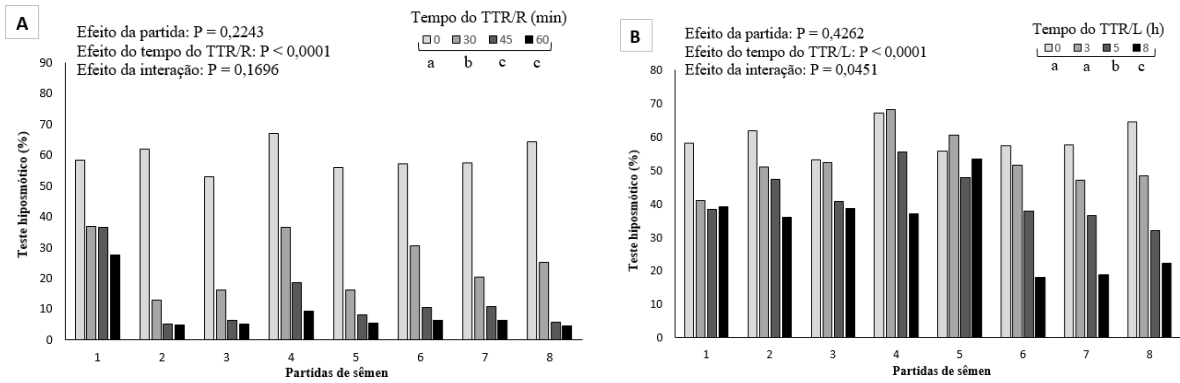
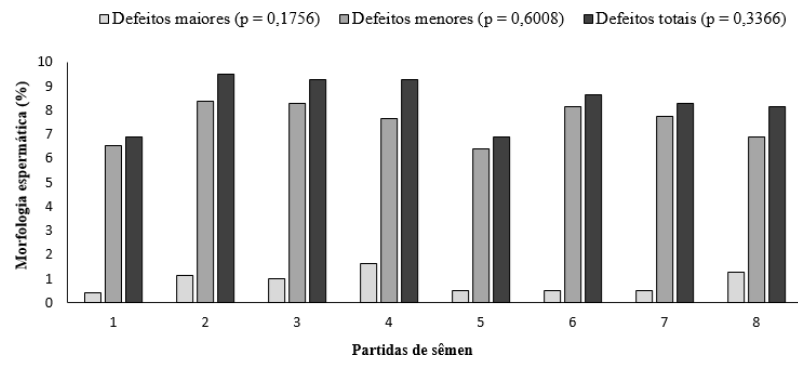


Figura 6:

Anexo 1:

Setup realizado no CASA foi: ANALYSIS SETUP - Bovino

Apply Sort: 0

Frames Acquired: 30

Frame Rate: 60 Hz

Minimum Contrast: 60

Minimum Cell Size: 6

Pixels Minimum Static Contrast: 1

Straightness (STR), Threshold: 60,0 %

Vap Cutoff: 20,0 $\mu\text{m/s}$

Prog. Min VAP: 40,0 $\mu\text{m/s}$

VSL Cutoff: 2,0 $\mu\text{m/s}$

Cell Size: 6 Pixels

Cell Intensity: 168

Static Head Size: 0,10 to 3,40

Static Head Intensity: 0,30 to 1,50

Static Elongation: 8 to 95

Slow Cells Motile: NO

Magnification: 1,92

Video Frequency: 60

Bright Field: NO LED

Illumination Intensity: 2175 IDENT

Illumination Intensity: 0

Temperature, Set: 38,0 °C

Chamber depth: 10,0 μm

Chamber position: 3,9 mm

Chamber position B: 11,8 mm

Chamber position C: 16,3 mm

Chamber position D: 26,6 mm

Chamber type: Makler Field

Selection Mode: SELECT IDENT

Fluorescent Option: OFF

Integrating Time: 1 Frames

Remote image recall: NO