



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - Unesp
CAMPUS DE JABOTICABAL



**CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E MORFOLÓGICAS DO
SÊMEN DE *Bos taurus* E *Bos indicus* ANTES E APÓS A
CRIOPRESERVAÇÃO**

Douglas Augusto Franciscato
Médico Veterinário



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - Unesp
CAMPUS DE JABOTICABAL**



**CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E MORFOLÓGICAS DO
SÊMEN DE *Bos taurus* E *Bos indicus* ANTES E APÓS A
CRIOPRESERVAÇÃO**

Proponentes:

Pós-graduando: Douglas Augusto Franciscato

Orientadora: Profa. Adjunto Marion Burkhardt de Koivisto

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

2015

F818c Franciscato, Douglas Augusto
Características físicas e morfológicas do sêmen de *Bos taurus* e
Bos indicus antes e após a criopreservação / Douglas Augusto
Franciscato. -- Jaboticabal, 2015
xii, 39 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Marion Burkhardt de Koivisto
Banca examinadora: Leticia Zoccolaro Oliveira, Lindsay Unno
Gimenes
Bibliografia

1. Bovino. 2. Espermatozoide. 3. Criopreservação. 4. Subespécies.
4. Biotecnologi da reprodução. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.082:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

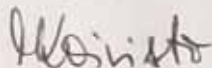
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E MORFOLÓGICAS DO SÊMEN DE *Bos taurus* E *Bos indicus* ANTES E APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO

AUTOR: DOUGLAS AUGUSTO FRANCISCATO


ORIENTADORA: Profa. Dra. MARION BURKHARDT DE KOIVISTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



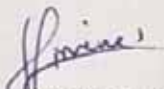
Profa. Dra. MARION BURKHARDT DE KOIVISTO

Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba



Profa. Dra. LETICIA ZOCCOLARO OLIVEIRA

Centro Universitário de Rio Preto / São José do Rio Preto/SP



Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 25 de maio de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Douglas Augusto Franciscato – nascido em Araraquara-SP, no dia 18 do mês de Maio de 1987. Concluiu o ensino médio no Colégio Oswaldo Cruz, na cidade de Matão-SP, em dezembro de 2004. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp Campus de Jaboticabal, na cidade de Jaboticabal-SP, em março de 2006, com conclusão em dezembro de 2010. Ingressou no curso de Pós-graduação, nível de Mestrado em março de 2012, sob orientação da Professora Adjunta Marion Burkhardt de Koivisto, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp Campus de Jaboticabal.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

À minha família, principalmente aos meus pais Jurandir e Silvia e minha irmã Mariana, obrigado por todo incentivo, apoio, compreensão e amor. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me proporcionar força e por ter me acompanhado por toda minha vida.

À Professora **Marion Burkhardt de Koivisto**, pela orientação e ensinamentos, paciência e oportunidades. Aprendi muito com a senhora durante esse período e cresci muito academicamente, profissionalmente e pessoalmente.

Aos membros da banca de qualificação, os professores **Wilter Ricardo Russiano Vicente** e **Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima** e ao **Marcus Antonio Rossi Feliciano**, pelos conselhos e críticas. Todos acrescentaram muito na melhoria deste trabalho.

Aos membros da banca de defesa, as professoras **Lindsay Unno Gimenes** e **Letícia Zoccolaro Oliveira**, por aceitarem o convite e colaborar com este trabalho.

Aos meus pais, **Jurandir Franciscato** e **Silvia Cristina de Souza Franciscato**, pelo amor, paciência, apoio e compreensão. Vocês são meus grandes exemplos de vida, além de serem um dos meus principais alicerces.

À minha irmã, **Mariana Cristina Franciscato**, pelo companheirismo e amor a mim dedicado, obrigado pelas conversas, vários momentos divertidos. Além de irmã você é minha melhor amiga!

À minha tia **Sônia Regina de Souza Cecheto**, você para mim é um exemplo de pessoa e de sucesso. Te amo!

Aos meus avós **Euvirio** e **Irene** que sempre torceram por mim e **Natalino** e **Teresa** que mesmo não estando mais presentes, sinto que sempre estão ao meu lado me guiando.

A um amigo que sempre me ajudou e me aconselhou, muito obrigado pela amizade **Ricardo Percin Nociti**.

Aos amigos **Caio José Chavier Abimussi** e **Diogo Cavenague Casanova**, os quais já conhecia mas que construímos uma grande amizade e irmandade no período que moramos juntos em Araçatuba. Obrigado pelos bons momentos de convívio.

Às amigas, **Juliane Trevisan Teramachi** e **Janaina Torres Carreira**, que sempre estiveram dispostas a me ajudar, obrigado pelos ensinamento, apoio e ensinamentos durante todo o projeto. Obrigado também **Bruna Kipper**, **Joana Zafalon** e **Izabela Pazzoto**, pelos momentos de convívio e ensinamentos, inclusive nos finais de semana de PROEX.

Aos outros bons amigos que fiz em Araçatuba: **Tailane**, **Rafael**, **Aline**, **Beatriz**, **Stefani** e **Bruno**. Obrigado pelos momentos que passamos juntos, nunca esquecerei de vocês!

À Central de Coleta e Processamento de Sêmen **CRV Lagoa**, ao **Athos Pastore** e **Carlinhos**, por me disponibilizarem os animais, materiais e infraestrutura para realizar parte de meu experimento.

Ao professor **Bruno Augusto Nassif Travençolo**, pela importante ajuda na informática deste trabalho, sempre disposto a tirar minhas dúvidas rapidamente.

Aos funcionários da FMVA, **Marta**, **Claudete**, **Silvia**, **Clélio** e **Esaú**, por terem me recepcionado muito bem na faculdade, ajudando com impressões, telefonemas e limpeza dos materiais.

Obrigado a todos os outros amigos, novos e velhos. Todos vocês tiveram seus momentos importantes durante essa trajetória.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – Câmpus de Jaboticabal** pela oportunidade da realização do Mestrado e à **Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – Câmpus de Araçatuba** pela disponibilidade de todo o material e laboratório.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão de Bolsa de Estudos durante o mestrado.

Cada um mencionado teve participação na realização desta etapa, seja na realização do trabalho, na convivência desse período ou com palavras de incentivo. Agradeço a todos, que mesmo sem saber, tornaram a realização dessa etapa possível.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

| | Página |
|--|-------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | VI |
| LISTA DE TABELAS..... | VIII |
| LISTA DE FIGURAS..... | IX |
| RESUMO..... | X |
| ABSTRACT..... | XI |
| 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA..... | 1 |
| 1.1. DIFERENÇA DO SÊMEN ENTRE AS SUBESPÉCIES..... | 2 |
| 1.2. CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES E SEUS DANOS..... | 3 |
| 1.3. MÉTODOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DO SÊMEN..... | 5 |
| 1.3.1. Morfologia Espermática..... | 6 |
| 1.3.2. Integridade de Membrana Plasmática..... | 7 |
| 1.3.3. Integridade de Acrossoma..... | 8 |
| 1.3.4. Peroxidação Lipídica..... | 8 |
| 1.3.5. Avaliação da Condensação da Cromatina e Morfometria Espermática pela Coloração do Azul de Toluidina..... | 9 |
| 2. HIPÓTESE..... | 12 |
| 3. OBJETIVO..... | 12 |
| 3.1. Objetivos específicos..... | 12 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 13 |
| 4.1. Seleção dos animais e preparo das amostras..... | 13 |
| 4.2. Motilidade de Vigor..... | 13 |
| 4.3. Análise morfológica dos ejaculados..... | 13 |
| 4.4. Avaliação da Integridade das Membranas – PI e FITC-PSA..... | 14 |
| 4.5. Teste Hiposmótico..... | 15 |
| 4.6. Avaliação da Peroxidação Lipídica Utilizando TBARS..... | 16 |
| 4.7. Avaliação da Condensação da Cromatina e Morfometria Espermática com Azul de Toluidina..... | 17 |
| 4.8. Análise Estatística..... | 18 |
| 5. RESULTADOS..... | 20 |
| 5.1. Análise da Motilidade, Vigor e Morfologia Espermática..... | 20 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 5.2. | Avaliação de Acrossoma, Membrana Plasmática e Peroxidação Lipídica..... | 23 |
| 5.3. | Avaliação da Condensação da Cromatina e Morfometria da Cabeça Espermática com Azul de Toluidina..... | 23 |
| 6. | DISCUSSÃO..... | 25 |
| 7. | CONCLUSÃO..... | 30 |
| 8. | REFERÊNCIAS..... | 31 |

LISTA DE ABREVIATURAS

% = Porcentagem

< = Menor

> = Maior

°C= Graus célsius

µg = Microgramas

µL = microlitros

µM = microMolar

µg/mL = Microgramas por mililitros

B. indicus = *Bos indicus*

B. taurus = *Bos taurus*

CCPS = Centro de Coleta e Processamento de Sêmen

FITC = Isoticionato de Fluoresceína

FITC-PSA = Isoticionato de Fluoresceína conjugado à aglutinina de *Pisum sativum*

FIV = Fertilização *in vitro*

g = força gravitacional

HIPO = Teste Hiposmótico

IA = Inseminação Artificial

M = Molar

MDA = malanóldeído

mg/mL = Miligramas por mililitros

mL = Mililitros

mM = microMolar

mOsm/Kg = Miliosmoles por quilograma

nm = nanômetros

PI = Iodeto de Propídio

PNA = aglutinina de amendoim

PSA = aglutinina de *Pisum sativum*

PUFAS = Ácidos Graxos Poliinsaturados

ROS = Espécies Reativas de Oxigênio

sd = Desvio padrão

TALP-sêmen = "Tyrode's albumin lactate and pyruvate" livre de Ca⁺⁺

TBA = Ácido Tiobarbitúrico

TBARS = Substancias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TE = Transferência de Embrião

UNESP = Universidade Estadual Paulista

\bar{x} = Média

LISTA DE TABELAS

Páginas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (sd) da motilidade (porcentagem) e vigor (0 – 5) de touros <i>B. taurus</i> e <i>B. indicus</i> antes e após a criopreservação e descongelamento, Araçatuba, SP, 2015. | 20 |
| Tabela 2. Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (sd) da porcentagem de defeitos maiores, menores e totais de touros <i>B. taurus</i> e <i>B. indicus</i> antes e após a criopreservação, Araçatuba, SP, 2015. | 21 |
| Tabela 3. Valores médios (\bar{x}) e erro padrão (se) da porcentagem das anormalidades espermáticas para as subespécies <i>B. taurus</i> e <i>B. indicus</i> antes e após a criopreservação, Araçatuba, SP, 2015. | 21 |
| Tabela 4. Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (sd) das variáveis membrana plasmática pelo teste do PI (%) e HIPO (%), acrossoma pelo teste do FITC-PSI (%) e peroxidação lipídica (ng/ml) pelo teste TBARS de touros <i>B. taurus</i> e <i>B. indicus</i> antes e após a criopreservação e descongelamento, Araçatuba, SP, 2015. | 23 |
| Tabela 5. Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (sd) das variáveis morfométricas da cabeça, descompactação e heterogeneidade da cromatina de espermatozoides de touros <i>B. taurus</i> (10) e <i>B. indicus</i> (10) de amostras de sêmen fresco e após o congelamento e descongelamento, avaliados pela técnica do Azul de Toluidina, Araçatuba, SP, 2015. | 24 |

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Cabeça espermática de acordo com os descritores Fourier 0 – 5. O Fourier 0 (F0) afeta o tamanho geral espermático, F1 a cabeça anterior, F2 o comprimento, F3, F4 e F5 a região da cabeça posterior (adaptado de PARRISH et al., 2012);11
- Figura 2.** Fotomicrografia digital de espermatozoides corados com Iodeto de propídio e FITC-PSA. Araçatuba, SP, 2015. **A:** espermatozoides corados pelo PI e FITC-PSA (membrana plasmática e acrossoma lesados); **B:** espermatozoides corados pelo PI (membrana plasmática lesada); **C:** espermatozoide com membrana e acrossoma intactos. Araçatuba, SP, 2015;15
- Figura.3.** Fotomicrografia digital de espermatozoides avaliados pelo teste hiposmótico. Araçatuba, SP, 2015. **A:** espermatozoides que apresentam cauda dobrada (atividade bioquímica da membrana plasmática intacta); **B:** espermatozoide que apresenta cauda reta (alteração da atividade bioquímica da membrana plasmática). Araçatuba, SP, 2015;16
- Figura 4.** Fotomicrografia digital de espermatozoides corados com Azul de Toluidina. Araçatuba, SP, 2015.18

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E MORFOLÓGICAS DO SÊMEN DE *Bos taurus* E *Bos indicus* ANTES E APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO

Resumo

O objetivo deste trabalho foi verificar as alterações que ocorrem nas células espermáticas durante o processo de criopreservação nas diferentes subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus*. Analisou-se o ejaculado de 20 animais (10 de cada subespécie) quanto à motilidade, morfologia espermática, integridade de membrana plasmática e acrossoma, peroxidação lipídica, condensação da cromatina e morfometria da cabeça do espermatozoide no sêmen fresco e após criopreservação/descongelamento. Nas avaliações com sêmen fresco, a subespécie *Bos taurus* mostrou resultados de motilidade superior quando comparada aos zebuínos ($68,00\% \pm 6,32\%$ e $63,00\% \pm 4,83\%$ respectivamente, $p < 0,05$). Os animais europeus mostraram melhor congelabilidade do sêmen, pois seus espermatozoides, de maneira geral, foram menos afetados pelo processo de criopreservação (*B. taurus* – Motilidade (%): $38,00 \pm 7,88$, HIPO (%): $40,4 \pm 6,45$, Área: $11556,14 \pm 2055,46$, Perímetro: $25,17 \pm 1,87$, Largura: $5,22 \pm 0,96$, Fourier 2: $7867,27 \pm 1965,47$; *B. indicus* - Motilidade: $30,00 \pm 4,71$, HIPO: $27,5 \pm 6,98$, Área: $12416,06 \pm 2232,06$, Perímetro: $26,02 \pm 2,02$, Largura: $5,31 \pm 0,97$, Fourier 2: $8536,77 \pm 2058,21$). Foi observado que a criopreservação causa danos em todas as estruturas espermáticas, independentemente da subespécie, indicando que avanços nesta técnica ainda são necessários.

Palavras-chave: Bovino, Espermatozoide, Criopreservação, Subespécies, Biotecnologia da Reprodução

PHYSICAL AND MORPHOLOGICAL OF SPERM *Bos taurus* AND *Bos indicus* OF BEFORE AND AFTER CRYOPRESERVATION

Abstract

This study aimed to verify the changes that occur in sperm cells during the process of cryopreservation between the different subspecies *Bos taurus* and *Bos indicus*. Semen from 20 animals (10 of each subspecies) fresh and after cryopreservation / thawing, were analyzed for motility, sperm morphology, plasma membrane and acrosome integrity, lipid peroxidation, chromatin condensation and sperm head morphology. The fresh semen evaluations results of the subspecies *Bos taurus* showed higher motility when compared to Zebu ($68.00\% \pm 6.32\%$ and $63.00\% \pm 4.83\%$ respectively). European animals showed better freezability semen, in general, because their sperm were less affected by the cryopreservation process (*B. taurus* – Motility (%): 38.00 ± 7.88 , HYPO (%): 40.4 ± 6.45 , Area : 11556.14 ± 2055.46 , Perimeter: 25.17 ± 1.87 , Width: 5.22 ± 0.96 , Fourier 2: 7867.27 ± 1965.47 ; *B. indicus* - Motility: 30.00 ± 4.71 , HYPO: 27.5 ± 6.98 , area: 12416.06 ± 2232.06 , Perimeter: 26.02 ± 2.02 , Width: 5.31 ± 0.97 , Fourier 2: 8536.77 ± 2058.21). It was observed that cryopreservation damages all sperm structures, regardless of subspecies, indicating that improvements in this technique are still needed.

Keywords: Bovine, Spermatozoa, Criopreservation, Subspecies, Reproduction Biotechnologies.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil possui o segundo maior rebanho de bovinos do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças, sendo o agronegócio brasileiro destaque no cenário mundial (MAPA, 2015). Em setembro de 2013, foram abatidos aproximadamente 2,8 milhões de bovinos para a produção de carne (IBGE, 2014). Entretanto é necessário que haja melhorias nesta cultura, como por exemplo, a busca de maior qualidade da base genética dos rebanhos, por meio de biotecnologias como inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e técnicas de fertilização *in vitro* (GONZALEZ, 2004). Em 2013, foram comercializadas 13.024.033 doses de sêmen tanto nacional como importado, mostrando aumento de 5,54% em relação ao ano anterior onde foram comercializadas 12.340.321 doses (ASBIA, 2014).

Apesar do importante papel da IA na melhoria da produtividade dos rebanhos, ainda existem muitos fatores que contribuem para índices insatisfatórios nos programas de reprodução, como por exemplo, a qualidade do sêmen a ser utilizado (OLIVEIRA et al., 2012), onde níveis diferentes de fertilidade são atribuídos a variações nas características qualitativas da célula espermática (CORREA et al., 1997b). Nas técnicas de fertilização *in vitro* (FIV), a qualidade do sêmen também pode interferir na capacidade de fertilizar oócitos e desenvolvimento embrionário (SUDANO et al., 2011).

O potencial reprodutivo de touros tem grande importância para viabilidade comercial e sucesso das biotecnologias de melhoramento. O espermograma, atualmente é considerado o método mais utilizado para avaliar a capacidade reprodutiva desses animais (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O gado pode ser dividido em duas subespécies principais: *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Muitas vezes consideradas espécies diferentes, esses animais apresentam características fisiológicas e anatômicas distintas (FELIUS, 1985). Bovinos da subespécie *indicus* são mais adaptados a temperaturas ambientais elevadas do que animais *taurus* (KOIVISTO et al., 2009)

No entanto, no espermograma de rotina, diferenças morfológicas entre os espermatozoides dessas duas subespécies não são levadas em consideração. Portanto, para que as características filogenéticas não sejam consideradas anormalidades, é necessário realizar a caracterização quantitativa completa da morfologia dos espermatozoides de *B. taurus* e *B. indicus* (BELETTI, 2005a).

A criopreservação e o descongelamento induzem várias mudanças nas células espermáticas de mamíferos (MEDEIROS et al., 2002). Mesmo com protocolos de criopreservação otimizados, cerca de 40 a 50% da população de espermatozoides não sobrevive ao processo. Quando comparações são feitas em relação aos espermatozoides viáveis, levando-se em consideração a motilidade, os resultados geralmente se mostram inferiores no sêmen criopreservado, indicando que mesmo a subpopulação de células viáveis após criopreservação é comprometida (WATSON, 2000).

Desta forma, faz-se necessário investigar as diferenças entre as características físicas e morfológicas entre os ejaculados das duas subespécies e como suas células espermáticas se comportam quando submetidas ao processo de criopreservação.

1.1 DIFERENÇA DO SÊMEN ENTRE AS SUBESPÉCIES

Nas estações mais quentes do ano o gado zebuino (*B. indicus*), quando comparado com raças europeias (*B. taurus*), apresenta menor queda: da ingestão de alimentos; taxa de crescimento (CARTWRIGHT, 1995); produção de leite (JOHNSON, 1995); função reprodutiva (ROCHA et al., 1998).

A fertilidade dos touros é de extrema importância na eficiência da produção de bovinos de corte. Em condições tropicais, touros *B. taurus* apresentam menor fertilidade em comparação aos animais *B. indicus* (OHASHI et al., 1988). Estudo de NICHII et al. (2006) evidenciou que touros de origem europeia (*B. taurus*) apresentaram maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no verão, aumentando o número de espermatozoides inviáveis no ejaculado quando comparado aos animais de origem indiana (*B. indicus*). Outra pesquisa também demonstrou o efeito da temperatura ambiental elevada, afetando mais a espermatogênese e maturação espermática em touros de origem europeia (KOIVISTO et al., 2009).

Em condições tropicais, touros *B. indicus* mostram maior produção de espermatozoides em relação a touros *B. taurus* (BRITO et al., 2002), enquanto que animais de raças taurinas (*B. taurus*) evidenciaram melhor congelabilidade do sêmen em períodos de temperaturas elevadas em relação às raças zebuínas (*B. indicus*) (ANCHIETA et al., 2005). Neste mesmo estudo, verificou-se aumento de descarte do sêmen dos touros zebuínos por apresentarem características físicas (concentração),

como indesejáveis, enquanto as características morfológicas foram responsáveis pelo descarte do sêmen dos animais taurinos.

1.2 CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES E SEUS DANOS

A criopreservação de espermatozoides requer aprimoramento constante já que a maioria dos espermatozoides perde sua integridade ou função durante o mesmo. Este aprimoramento pode ser alcançado, utilizando-se diferentes diluidores que interajam com as células espermáticas oferecendo proteção a seus vários compartimentos durante os processos de refrigeração, congelação e descongelação (HOLT, 2000).

Nos protocolos de criopreservação, os espermatozoides são submetidos a uma série de desafios prejudiciais como a rápida mudança de temperatura (WATSON, 1981), adição de crioprotetores levando ao estresse osmótico e tóxico (GAO et al., 1995) e a formação de cristais de gelo no meio extracelular (WATSON & DUNCAN, 1988).

A diminuição da motilidade do sêmen criopreservado é característica marcante, pois pequena parte das células mostra vigorosa progressão, enquanto a maioria tem grau variável de comprometimento dessa função. Esse aspecto é de grande importância para a queda do potencial de fertilização do sêmen quando introduzido no trato reprodutivo da fêmea (WATSON, 2000).

Estudo de CELEGHINI et al. (2008) mostrou que houve diminuição na motilidade de espermatozoides após congelamento e descongelamento, mesmo utilizando diluidores diferentes. Os autores verificaram também o aumento de espermatozoides com morfologia anormal dando ênfase aos defeitos de acrossoma.

O processo de criopreservação é estressante para os espermatozoides, afetando principalmente a membrana espermática. A extensão dos danos pode variar de alterações na organização, fluidez, permeabilidade e composição lipídica da bicamada da membrana e ruptura total da mesma (WATSON, 1981). Estes danos ocorrem devido a mudanças na temperatura e osmolaridade causando alterações na membrana plasmática, acrossomal e função mitocondrial (AMANN & PICKETT, 1987).

Já se sabe que o arrefecimento rápido do sêmen (30-0°C) leva à tensão letal em um variável número de células, equivalente à taxa de arrefecimento (WATSON, 1981). Mesmo este processo realizado de maneira lenta, induz tensão sobre as

membranas devido à mudança na temperatura e provavelmente isso está relacionado com as mudanças de fase dos lipídios e alteração no estado funcional das membranas (WATSON, 2000). Além disso, a toxicidade do glicerol pode causar alterações na membrana plasmática do espermatozoide (KATKOV et al., 1998).

A membrana espermática tem papel crucial na manutenção da capacidade de fertilização. Essa membrana é responsável pela preservação da homeostase celular e sua integridade é vital para a sobrevivência da célula espermática no trato reprodutivo da fêmea e manutenção da capacidade fertilizante (ÕURA & TOSHIMORI, 1990). Na criopreservação ocorre mudança de volume das células devido à circulação de água e solutos através da membrana plasmática, causando alteração no volume da célula induzindo estresse osmótico (GAO et al., 1997).

A integridade do acrossoma tem grande importância na fecundação do oócito, pois a reação acrossômica é fundamental para a penetração do espermatozoide na zona pelúcida e fusão da membrana plasmática do oócito (FLESCH & GADELLA, 2000). Estudos demonstraram que o processo de congelamento do sêmen pode induzir a capacitação ou reação acrossomal prematura nos espermatozoides (NEILD et al., 2003). Essas alterações reduzem a fertilidade do espermatozoide, a capacidade de interação com o trato reprodutivo da fêmea e sua expectativa de vida (MEDEIROS et al., 2002).

A membrana espermática possui grande concentração de ácidos graxos poli-insaturados, os quais são altamente susceptíveis à peroxidação (ALVAREZ & STOREY, 1995). Sabe-se que a criopreservação induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são prejudiciais ao desempenho das células espermáticas (O'FLAHERTY et al., 1997). Os espermatozoides vivem em ambiente aeróbio e enfrentam as ROS, que causam a peroxidação de ácidos graxos dos fosfolipídios da membrana, afetando sua função (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1995). O processo de congelamento e descongelamento induz o aumento dessa peroxidação lipídica (ALVAREZ & STOREY, 1995).

Espermatozoides de mamíferos são extremamente sensíveis à peroxidação lipídica, devido a moléculas parcialmente reduzidas de oxigênio, que oxidam os lipídios da membrana. Essa peroxidação espontânea das membranas espermáticas de mamíferos destrói a estrutura da matriz lipídica, devido ao ataque das ROS (AITKEN et al., 1993). A peroxidação lipídica altera a fluidez da membrana, que pode afetar a capacidade de fusão das membranas espermáticas, função de grande

importância durante a reação acrossomal (BALL, 2008). As ROS causam ainda fragmentação do DNA do espermatozoide, prejudicando o potencial de fertilização do sêmen (FRASER & STRZEZEK, 2007).

Os danos causados pela criopreservação podem alterar a estrutura da cromatina e originar alterações do DNA, podendo ser observado em espermatozoides de bovinos, suínos, felinos, ovinos e humanos (GILLAN & MAXWELL, 1999). Essas alterações podem afetar o desenvolvimento embrionário precoce (D'OCCHIO et al., 2007), acometendo o desenvolvimento pré-implantação, podendo ocorrer falhas na implantação e aumento das taxas de mortalidades embrionárias (AITKEN & BAKER, 2006). Além disso, sabe-se que espermatozoides morfológicamente normais e móveis, mas com menor qualidade da cromatina, são fator limitante para sua capacidade de fertilização (GANDINI et al., 2006). Como a cabeça da célula espermática de mamíferos é constituída quase inteiramente de cromatina, qualquer pequena mudança em sua organização, pode afetar o formato de sua cabeça (OSTERMEIER et al., 2001).

Nos mamíferos domésticos, algumas perdas de fertilidade devido à criopreservação são compensadas por doses inseminantes com alta concentração de espermatozoides (WATSON, 2000).

1.3 MÉTODOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DO SÊMEN

Os métodos utilizados na rotina para análise do sêmen bovino como avaliação subjetiva da motilidade, concentração e porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais, apresentam valor limitado para predizer a fertilidade e qualidade da amostra (MEYERS, 2007). Aspectos da qualidade do sêmen como integridade do acrossoma (CORREA et al., 1997b), da membrana plasmática (JANUSKAUSKAS et al., 2000), proteínas da membrana (PARENT et al., 1999) e integridade do DNA (JANUSKAUSKAS et al., 2001) vem sendo estudados. Parâmetros convencionais do sêmen como: concentração, vitalidade, motilidade e morfologia, analisados por microscopia óptica, revelam de maneira parcial a capacidade funcional do espermatozoide em fertilizar o oócito. Técnicas recentes como a utilização de sondas fluorescentes avaliam acrossoma, membrana plasmática e integridade de DNA do espermatozoide. O tipo e a extensão dos danos podem ser

analisados por meio da microscopia de fluorescência, citometria de fluxo ou análise computadorizada (KUMAR et al., 2014).

1.3.1 Morfologia Espermática

A estrutura da célula espermática desempenha importante papel tanto na fertilização quanto no desenvolvimento embrionário. As anormalidades morfológicas podem variar desde defeitos evidentes até mais sutis (BARTH & OKO, 1989). A maior parte das anormalidades que envolvem a cabeça do espermatozoide, onde estão localizados mecanismos importantes para a fertilização e material genético do macho, estão ligadas à disfunção da fertilidade (NIKOLETTOS et al., 1999).

Recente estudo observou correlação entre a morfologia espermática anormal e baixa qualidade do DNA do espermatozoide, podendo causar queda na fertilidade do sêmen e prejudicar o desenvolvimento dos embriões fecundados (ENCISO et al., 2011). Anormalidades da cabeça do espermatozoide podem refletir falha na espermatogênese, produzindo embriões com baixo potencial para manutenção da prenhez (TASDEMIR et al., 1997).

A deformidade do acrossoma pode ser descrita como área de espessamento, dando aspecto irregular ao ápice da célula afetada, devido ao excesso da matriz acrossomal, juntamente com o dobramento do acrossoma no ápice da célula espermática (*knobbed acrosome*). A maioria das células espermáticas com esta alteração apresenta ápice achatado, tendo ou não a presença de gota citoplasmática. Em bovinos essa anormalidade foi relatada causando esterilidade ou fertilidade reduzida (BARTH & OKO, 1989). Na fertilização *in vitro* e culturas de embriões, espermatozoides com *knobbed acrosome* têm menor capacidade de penetrar a zona pelúcida dos oócitos (THUNDATHIL et al., 2000).

Outra anormalidade são espermatozoides apresentando estreitamento da cabeça (forma de pera ou piriforme), com acrossoma normal ou com estreitamento da região pós-acrossomal (MENKVELD et al., 2011). Estudos *in vivo* (BARTH et al., 1992) e *in vitro* (THUNDATHIL et al., 1999) mostraram que células com este defeito podem não fertilizar os oócitos ou apresentar desenvolvimento embrionário prejudicado.

A separação entre cauda e cabeça do espermatozoide pode ser causada por inúmeros fatores, que podem ter origem tanto na espermiogênese ou na maturação espermática (BARTH & OKO, 1989). A cabeça isolada pode ser encontrada em amostras de sêmen de touros com fertilidade normal (ALUN-JONES, 1962) ou causar

a infertilidade dependendo da quantidade de células afetadas (THUNDATHIL et al., 2012).

Gotas citoplasmáticas são os defeitos comuns, podendo se localizar tanto na parte proximal ou distal da cauda (PESCH & BERGMAN, 2006). A porcentagem elevada de células com gota citoplasmática proximal pode afetar de forma negativa a fertilidade do sêmen (MORTIMER et al., 1991). Altos níveis de gota citoplasmática proximal também podem interferir na qualidade do sêmen, no que se diz respeito à integridade de membrana plasmática e acrossomal, além de mostrar alta correlação com danos na cromatina após descongelação e incubação da amostra por 3h a 37°C (CARREIRA et al., 2012).

Outra anomalia encontrada é a cauda dobrada na região distal da peça intermediária do espermatozoide assemelhando-se à letra J, podendo apresentar gota citoplasmática presa na parte interna da cauda fletida. Espermatozoides com esse defeito mostram motilidade alterada (THUNDATHIL et al., 2012).

Animais que apresentam inserção abaxial da cauda ou caudas acessórias podem apresentar fertilidade normal (BARTH & OKO, 1989; KOIVISTO et al., 2010).

1.3.2 Integridade de Membrana Plasmática

A avaliação da integridade da membrana plasmática reflete a viabilidade espermática e possíveis danos podem ocorrer após a criopreservação (HAMMADEH et al., 1999), sendo um dos testes mais utilizados em laboratório (CELEGHINI et al., 2007).

Sua integridade pode ser avaliada por citometria de fluxo utilizando sondas fluorescentes como o iodeto de propídio (PI) (PINTADO et al., 2000), que se liga especificamente ao DNA, corando-o de vermelho fluorescente se a membrana estiver lesada (ARRUDA & CELEGHINI, 2003).

O teste hiposmótico analisa a atividade bioquímica da membrana plasmática intacta, devido ao influxo de água para o interior das células (VERA-MUNOZ et al., 2009) e baseia-se no transporte da água por meio da membrana espermática em solução hiposmótica. Quando o mecanismo de transporte estiver adequado, a água é capaz de fluir para dentro da célula e provocar o inchaço da membrana plasmática ao longo da cauda e seu enrolamento (DEVIREDDY et al., 2002). Assim, quanto maior for o número de células com membranas plasmáticas inchadas, ou seja, caudas

enroladas após estresse hiposmótico, melhor será a qualidade da amostra (CURRY & WATSON, 1994).

A avaliação pode ser realizada por meio de soluções com osmolaridade que podem variar de 0 a 300 mOsm/kg. Em pesquisa realizada por MARTINS et al. (2011), diluições (60, 100 e 150 mOsm/kg) foram testadas, sendo que os resultados não mostraram diferença significativa para o sêmen *in natura* e o criopreservado. As soluções mais utilizadas são de 150 mOsm/kg para o sêmen *in natura* e 100 mOsm/kg para o sêmen criopreservado (REVELL & MRODE, 1994).

O ensaio hiposmótico (HIPO) é aplicado como indicador de fertilidade em bovinos (REVELL & MRODE, 1994), podendo ser usado tanto em sêmen fresco quanto congelado (CORREA et al., 1997a; CORREA et al., 1997b). Este teste mostrou correlação positiva com resultados de fertilidade *in vivo* (BRITO et al., 2003).

1.3.3 Integridade de Acrossoma

O monitoramento de danos e reação prematura do acrossoma por meio da citometria de fluxo no sêmen de bovinos (NAGY et al., 2003) representa importante ferramenta na investigação e diagnóstico da infertilidade (ESTEVES et al., 2007).

Embora a reação acrossomal seja vital para fertilização, ela só é vantajosa se ocorrer nas proximidades do oócito, de outra maneira ocorrerá morte prematura do espermatozoide (PRATHALINGAM et al., 2006).

Os métodos de coloração do acrossoma envolvem lecitinas vegetais marcadas com sondas fluorescentes (isotiocianato de fluoresceína – FITC) (NAGY, 2003), como a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) (MENDOZA et al., 1992) e a aglutinina de amendoim (PNA) (CHENG et al., 1996). Os conjugados de lecitina se ligam as porções de carbono hidratados específicos das glicoproteínas que se localizam exclusivamente no acrossoma e assim coram as células que apresentam danos (HOLDEN et al., 1990). O PSA quando conjugado ao FITC, marca o acrossoma danificado em verde-amarelado (ARRUDA et al., 2003). O PSA tem afinidade para o terminal α -D-glicosil e α -D-manosil das glicoproteínas e se liga especificamente ao açúcar-manosídeo encontrado no conteúdo acrossomal (CROSS et al., 1986).

1.3.4 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é classificada como deterioração oxidativa dos lipídios poliinsaturados. Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS) contêm duas ou mais

ligações duplas entre carbonos (H_2C-CH_2), por isso são alvos de radicais livres (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Os espermatozoides de ruminantes são susceptíveis ao estresse oxidativo devido à abundância de PUFAS em sua membrana plasmática. Estes ácidos graxos são responsáveis pela fluidez e flexibilidade das membranas, auxiliando o espermatozoide nos eventos de fusão de membranas associado à fertilização. Assim sendo, devido às suas ligações duplas, pode ocorrer o ataque de radicais livres, dando início à peroxidação lipídica, levando à subsequente perda da integridade morfológica e de membrana, funções celulares comprometidas, motilidade alterada e indução de apoptose da célula espermática (BUCAK et al., 2010).

O método do ácido tiobarbitúrico (TBA) é o mais utilizado para mensurar a lipoperoxidação, realizado com auxílio de espectrofotômetro, que mede a concentração dos produtos oriundos da peroxidação lipídica. Durante o início desse fenômeno, ocorre o acúmulo de hidroperóxidos de lipídios na membrana espermática, os quais se decompõem formando aldeídos, entre eles o malonaldeído. Este método mede o malonaldeído ou substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (SANOCKA & KURPISZ, 2004).

Existe correlação negativa entre a motilidade e a produção de TBARS. Amostras de sêmen bovino com menor motilidade e vigor apresentam-se susceptíveis à peroxidação lipídica e possuem menor capacidade de passar pela reação acrossomal comparados aos espermatozoides de amostras com menores níveis de lipoperoxidação (BEORLEGUI et al., 1997).

1.3.5 Avaliação da condensação da cromatina e morfometria espermática pela coloração do azul de toluidina

O estado da cromatina do espermatozoide interfere no empacotamento e proteção do DNA espermático, como também em sua capacidade de fertilizar o oócito e posterior descondensação do DNA (BALHORN et al., 2000), pois o grau de dano ao DNA tem grande correlação com o comprometimento do desenvolvimento embrionário (SELI et al., 2004). A deficiência de protamina pode estar relacionada a danos causados no DNA da célula espermática (AOKI et al., 2005).

A condensação do DNA ocorre durante o desenvolvimento das espermátides, quando as histonas são removidas dos nucleossomas e substituídas por proteínas nucleares de transição (BREWER et al., 2002). Em seguida, essas proteínas são

substituídas por protaminas, que envolvem o DNA e promovem sua condensação (FUENTES-MASCORRO et al., 2000). A natureza e o grau de interação entre as protaminas são essenciais para manter o estado da cromatina espermática, sendo que qualquer mudança pode levar a instabilidade da cromatina, podendo atrasar a formação nuclear paterna e também induzir a morte embrionária precoce (AOKI et al., 2005).

Método desenvolvido por MELLO (1982) utiliza um corante catiônico, o azul de toluidina, que apresenta metacromasia, que é a alteração de cor para violeta, induzida por ressonância de elétrons entre várias moléculas do corante. Esta propriedade auxilia na avaliação das anormalidades na condensação da cromatina espermática, onde esfregaços de sêmen são corados com azul de toluidina em pH 4,0. As moléculas do corante se ligam aos fosfatos ionizados no DNA, quando a cromatina espermática estiver condensada, a maior parte dos fosfatos é bloqueada pelas protaminas e por consequência, algumas moléculas do corante se ligam ao DNA, o que resulta em uma coloração que pode variar entre verde e azul claro. Já os espermatozoides que apresentam menor grau de compactação da cromatina, têm mais locais para as moléculas do corante se ligarem, resultando assim em uma coloração que pode variar do azul escuro ao magenta.

Análises morfométricas computadorizadas normalmente consideram medidas básicas como: área (A), perímetro (P), comprimento (C) e largura (L), razão largura/comprimento (C/L), elipsidade (E) e fator forma (FF), descritores Fourier com amplitude de 0 a 2 (F0, F1 e F2), simetria lateral (SL) e simetria anteroposterior (SAP) (OSTERMEIER et. al., 2001; BELETTI & COSTA, 2003). Já que a cabeça dos espermatozoides de mamíferos tem sua maior parte constituída por cromatina, anormalidades morfológicas seriam acompanhadas por alterações na cromatina (ENCISO et al., 2011).

Os descritores Fourier (amplitude harmônica) avaliam o perímetro de curvatura espermática, juntamente com as variáveis básicas (A, P, L e C) reflete mais eficazmente as variações de tamanho e, principalmente, de forma do núcleo espermático (OSTERMEIER et al., 2001).

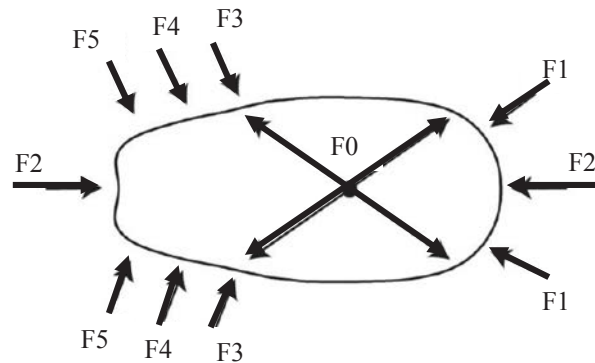


Figura 1. Cabeça espermática de acordo com os descritores Fourier 0 – 5. O Fourier 0 (F0) afeta o tamanho geral espermático, F1 a cabeça anterior, F2 o comprimento, F3, F4 e F5 a região da cabeça posterior (adaptado de PARRISH et al., 2012).

A coloração com azul de toluidina permite que seja feita a análise morfométrica concomitantemente com a análise da cromatina espermática (BELETTI et al., 2005b).

2. HIPÓTESE

- Características físicas e morfológicas do sêmen de *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* se alteram na mesma intensidade após criopreservação.
- Há diferenças entre as características físicas e morfológicas do sêmen obtido de *Bos taurus taurus* ou *Bos taurus indicus*.

3. OBJETIVO

Avaliar as diferenças nas características do semen *in natura* e descongelado dos ejaculados das subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus* e quais são as mudanças sofridas pelas células espermáticas submetidas ao processo de criopreservação.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar a motilidade (%), vigor (0-5) e morfologia espermática;
- Estudar:
 - integridade de membrana plasmática e acrossoma por meio das sondas fluorescentes iodeto de propídio (PI) e aglutina de *Pisium sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA);
 - membrana espermática por meio do teste Hiposmótico;
 - peroxidação lipídica pela reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
 - concomitantemente a condensação da cromatina e morfometria da cabeça dos espermatozoides pela técnica do azul de toluidina;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Seleção dos animais e preparo das amostras

Foi realizado estudo experimental casualizado onde 20 machos hígdos adultos (entre três e sete anos), 10 animais da subespécie *Bos indicus* (raça nelore) e 10 animais da subespécie *Bos taurus* (9 animais da raça holandesa e um animal da raça jersey), foram mantidos em regime semi-extensivo de Centro de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS).

O sêmen desses animais foi colhido pelo método da vagina artificial no mês de julho de 2014. Um ejaculado de cada animal foi congelado de acordo com os padrões pré-estabelecidos da CCPS. O sêmen industrializado em palhetas foi acondicionado em raques e estocado em nitrogênio líquido e posteriormente avaliado.

O ejaculado de cada animal foi avaliado logo após a colheita e após o processo de criopreservação e descongelação.

As avaliações com sêmen fresco foram realizadas nas dependências do CCPS (CRV Lagoa, Sertãozinho-SP) e as avaliações de sêmen congelado nas dependências Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Unesp. As amostras congeladas em palhetas de 0,25ml, contendo meio Tris-gema, foram descongeladas a 35°C em banho-maria por 20 segundos e realizadas as análises descritas a seguir.

4.2 Motilidade e Vigor

Uma gota de sêmen foi depositada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C, e observada em microscópio de contraste de fase (200x). A motilidade foi determinada pela estimativa visual da porcentagem de células em movimento e também pela redução do campo pelo diafragma e contagem de 100 células com movimento progressivo retilíneo e células imóveis. O vigor foi avaliado de acordo com a velocidade do movimento progressivo dos espermatozoides, e classificado de 0 a 5, sendo 0 o mais lento e 5 o mais rápido (CBRA, 2013).

4.3 Análise morfológica dos ejaculados

Para contagem das anormalidades espermáticas foi utilizada a técnica de câmara úmida, onde uma gota de sêmen fresco diluído em solução formol-salina tamponada (CBRA, 2013) ou diluída (sêmen descongelado) em solução de cloreto de potássio (Comunicação pessoal J. Mitchell, J.R.) foi depositada entre lamina e

lamínula. Foram contadas 200 células em microscopia de contraste de interferência diferencial – DIC (1000x). O número de anormalidades morfológicas foi expresso em porcentagem de acordo com a classificação de BLOM (1973).

4.4 Avaliação da Integridade das Membranas – PI e FITC-PSA

Para avaliar simultaneamente a integridade do acrossoma e da membrana plasmática foram utilizadas sondas fluorescentes com aglutinina de *Pisium sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA), que tem propriedade de se ligar ao conteúdo acrossomal, fluorescendo em verde (CASEY et al., 1993). O iodeto de propídeo (PI), que não é permeável à membrana íntegra, se liga ao DNA fluorescendo em vermelho se a membrana estiver lesada (ARRUDA & CELLEGUINI, 2003) (Figura 1).

Para a coloração o sêmen foi ajustado para a concentração de 2×10^6 espermatozoides e lavados e centrifugados em solução TALP-sêmen (*Tyrodé's albumin lactate and pyruvate* livre de Ca^{++}), 8 μ L dessa solução foram adicionados em 20 μ L de TALP-sêmen e adicionados 0,6 μ L (0,2mg/mL) de PI e 10 μ L (100 μ g/mL) de FITC-PSA. A amostra foi incubada por 8 minutos a 37°C protegido da luz, e posteriormente analisado em microscópio de epifluorescência.

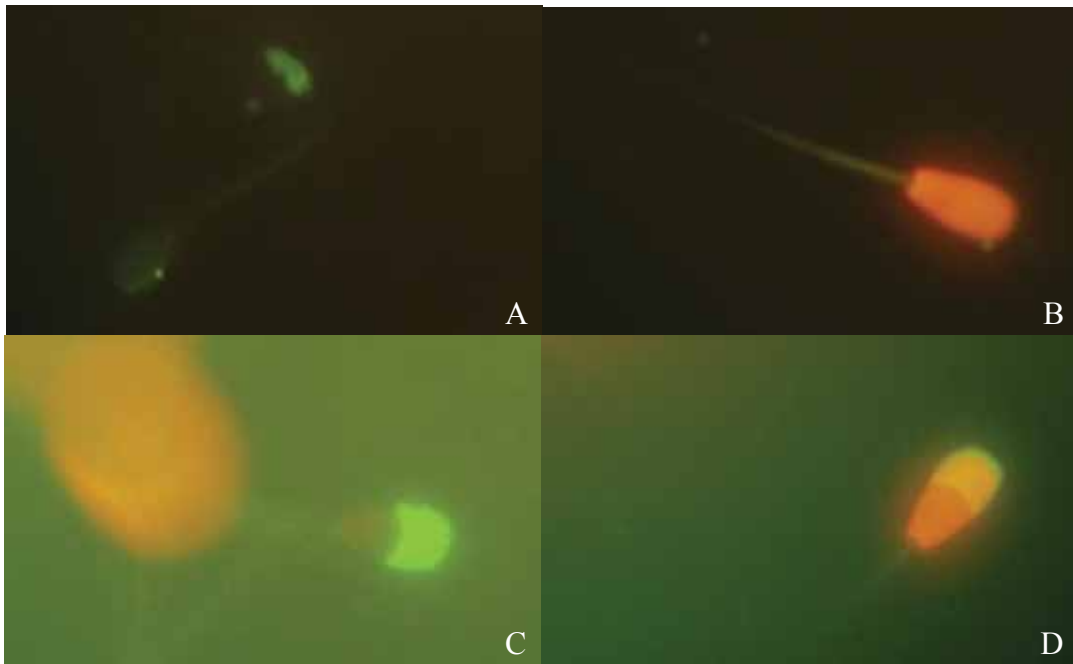


Figura 2. Fotomicrografia digital em aumento de 1000x de espermatozoides corados com Iodeto de propídio e FITC-PSA. Araçatuba, SP, 2015. **A:** espermatozoide não corado (membrana plasmática e acrossoma intactos); **B:** espermatozoide corado pelo PI (membrana plasmática lesada); **C:** espermatozoide corado pelo FITC-PSA (acrossoma lesado); **D:** espermatozoide corado pelo PI e FITC-PSA (membrana plasmática e acrossoma lesados);

4.5 Teste Hiposmótico

Para o HIPO, uma alíquota de 20µL de sêmen foi acrescentada a 1,0mL de uma solução com frutose e citrato-trisódico na concentração de 100mOsm/L, previamente aquecida à 37°C (Rota et al., 2000). Essa solução foi incubada em banho maria por 60 minutos à mesma temperatura.

Posteriormente, as amostras foram fixadas em 0,5mL de solução de formol-salina tamponada. Em seguida, uma amostra de 20µL de solução foi colocada entre lamina e lamínula para contagem de 100 espermatozoides, em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x, em objetiva de imersão.

As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada ou enrolada (Figura 2) e o resultado foi determinado em porcentagem, efetuando-se o cálculo pela fórmula: $HIPO (\%) = (\% \text{ de células com cauda dobrada após teste HIPO}) - (\% \text{ de células com cauda dobrada antes do teste HIPO})$ (Mello & Henry, 1999).

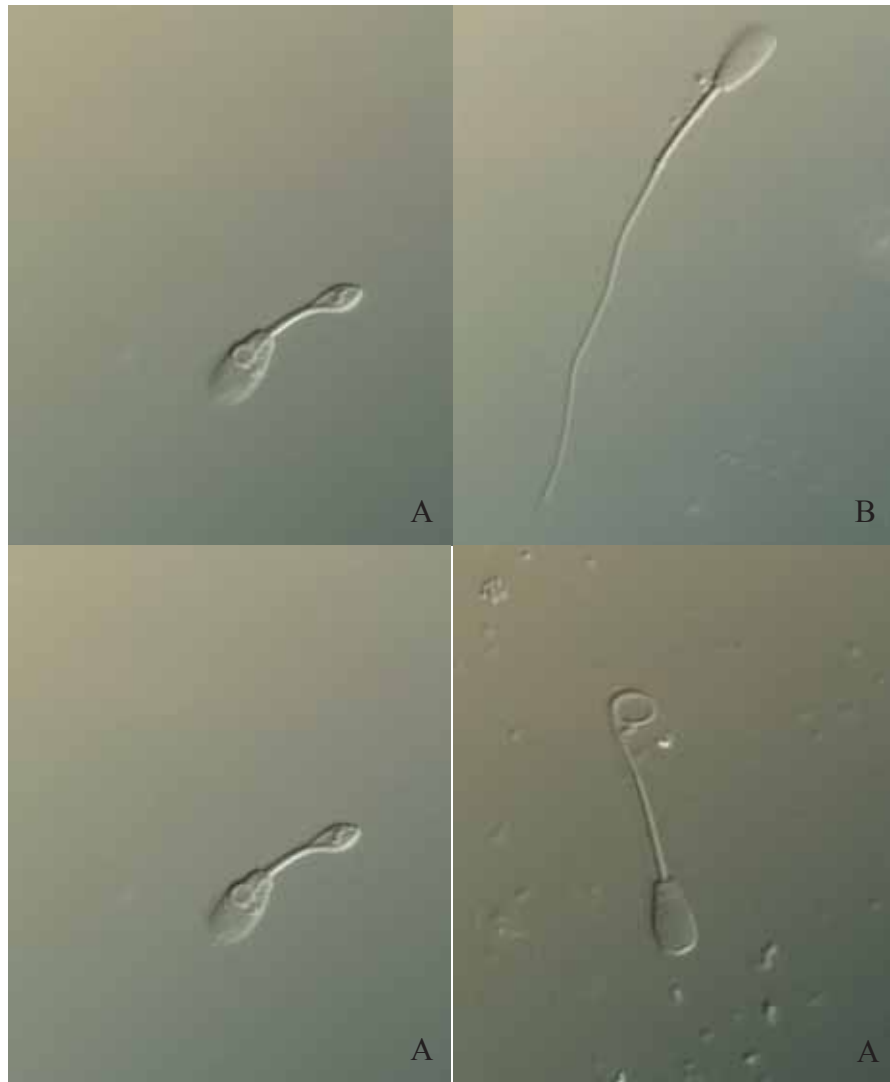


Figura 3. Fotomicrografia digital em aumento de 1000X de espermatozoides avaliados pelo teste hiposmótico. Araçatuba, SP, 2015. **A:** espermatozoides que apresentam cauda dobrada (atividade bioquímica da membrana plasmática intacta); **B:** espermatozoide que apresenta cauda reta (alteração da atividade bioquímica da membrana plasmática);

4.6 Avaliação da peroxidação lipídica utilizando TBARS

Para a determinação da peroxidação lipídica, 0,5mL de sêmen foram utilizados. O sêmen foi ajustado para uma concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. A primeira alíquota das amostras foi adicionada a 2mL de TBA 15% (ácido tricloroacético, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e 0,25M de ácido clorídrico), e aquecida a 100°C por 15 minutos e, em seguida, resfriada e centrifugada por 15 minutos a 1200g para formar um precipitado. O sobrenadante foi analisado ao espectrofotômetro em comprimento de onda de 532nm (MORANI, 2004).

A segunda alíquota foi destinada para o controle positivo como sistema gerador, que tem como objetivo medir todo o potencial que a amostra teria de gerar radical em questão. Para isso, as amostras foram incubadas com 0,24mM de cloreto de ferro e 50 μ M de hidroxitolunebutilado (MORANI, 2004).

Os resultados foram comparados a uma curva padrão preparada previamente com uma solução de malondealdeído que foi estabelecida no laboratório. A concentração de TBARS foi determinada empregando como coeficiente de extinção molar do MDA o valor $1,56 \times 10^5 \text{ x M}^{-1}$ (BUEGE & AUSTIN, 1978). A peroxidação lipídica foi expressa em nanogramas de TBARS/ 10^6 espermatozoides.

4.7 Avaliação da condensação da cromatina e morfometria espermática com Azul de Toluidina

Para avaliação da morfometria da cabeça do espermatozoide e condensação da cromatina foi utilizado o corante azul de toluidina, segundo o protocolo estabelecido por BELETTI & COSTA (2003). O protocolo para leitura em microscopia segue sucintamente descrito a seguir.

Foi realizado esfregão do sêmen, fixando em solução de etanol e ácido acético (3:1) por 1 minuto e em seguida etanol 70% por 3 minutos. Os esfregaços foram secos ao ar e em seguida hidrolisados por 25 minutos, em ácido clorídrico 4 N, lavados em água destilada e secos a temperatura ambiente. Em seguida foi colocada uma gota de azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine (citrato de sódio-fosfato), pH 4 e coberto com lamínula (BELETTI & COSTA, 2003).

Para a obtenção das fotos foi utilizado microscópio Olympus BX61 com objetiva de 100x, acoplado a uma câmera DP71 (Olympus) e conectado ao microcomputador PC. As imagens digitais (Figura 3) foram usadas para segmentar as cabeças dos espermatozoides de cada lâmina, para em seguida serem processadas por programas desenvolvidos em ambiente SCILAB (Scilab, INRIA – Institut National de recherche en informatique et automatique, Rocquencourt, França) para obter a média e desvio padrão dos valores de pixel dentro das cabeças de cada imagem (BELETTI & COSTA, 2003).

A referência da coloração normal dos espermatozoides foi utilizada por meio de seleção automática de seis cabeças em cada esfregaço e considerada a média dos valores (número) de pixel destas. Foram selecionadas as cabeças com as maiores médias de valores de pixel e as mais homogêneas. Em seguida foi determinada para

cada imagem a diferença entre o valor médio das cabeças-padrão e o valor médio de cada cabeça analisada. Será calculado o coeficiente de variação dos níveis de cinza (BELETTI et al., 2005b).

As variáveis morfométricas avaliadas foram: área (A), perímetro (P), largura (L), comprimento (C), razão largura/comprimento (L/C), elipsidade (E) e fator forma (FF) pelo uso de programas desenvolvidos no Scilab (BELETTI & COSTA, 2003). Descritores Fourier com amplitude de 0 a 2 (F0, F1 e F2) foram também considerados para caracterização e análise da forma (OSTERMEIER et al., 2001; BELETTI & COSTA, 2003).



Figura 4. Fotomicrografia digital em aumento de 1000X de espermatozoides corados com Azul de Toluidina. Araçatuba, SP, 2015.

4.8 Análise Estatística

Os dados das variáveis numéricas foram submetidos à análise de variância com modelo misto, para verificar se existe diferença significativa entre os grupos (zebuínos e taurinos), processo de criopreservação (sêmen fresco e congelado) e interação entre grupos e criopreservação. Para o teste das médias foi utilizado Tukey além da análise de correlações.

Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias pré-requisitos necessários para a análise de variância e se necessário, os dados das porcentagens foram transformados em arcsen %. As análises estatísticas

foram efetuadas empregando-se o programa R version 3.0.2 (Copyright (C) 2013 The R Foundation for Statistical Computing).

O nível de significância adotado foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Análise da motilidade, vigor e morfologia espermática

Houve diferença ($p < 0,05$) da motilidade e vigor entre o sêmen fresco e criopreservado, sendo que o sêmen *in natura* mostrou valores superiores em relação ao descongelado e entre as subespécies, animais de origem europeia obtiveram valores melhores de motilidade, tanto para o sêmen *in natura* como para o sêmen descongelado (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (sd) da motilidade (porcentagem) e vigor (0 – 5) de touros *B. taurus* e *B. indicus* antes e após a criopreservação e descongelamento, Araçatuba, SP, 2015.

| Grupos | <i>Bos taurus</i> | | <i>Bos indicus</i> | |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Sêmen Fresco | Sêmen Congelado | Sêmen Fresco | Sêmen Congelado |
| Motilidade | 68,00±6,32 ^a | 38,00±7,88 ^b | 63,00±4,83 ^c | 30,00±4,71 ^d |
| Vigor | 5,00±0,00 ^a | 3,40±0,52 ^b | 5,00±0,00 ^a | 3,40±0,52 ^b |

^{a,b,c,d} Valores médios seguidos de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A morfologia espermática apresentou diferença ($p < 0,05$) em relação ao sêmen fresco e descongelado, com um menor número de defeitos no sêmen *in natura*, mas não houve diferença entre as duas subespécies (tabela2).

Tabela 2. Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (sd) da porcentagem de defeitos maiores, menores e totais de touros *B. taurus* e *B. indicus* antes e após a criopreservação, Araçatuba, SP, 2015.

| Grupo | <i>Bos taurus</i> | | <i>Bos indicus</i> | |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Sêmen Fresco | Sêmen Congelado | Sêmen Fresco | Sêmen Congelado |
| Defeitos Maiores ($\bar{x} \pm sd$) | 3,20 \pm 0,03 ^a | 10,70 \pm 0,03 ^b | 2,80 \pm 0,01 ^a | 10,10 \pm 0,03 ^b |
| Defeitos Menores ($\bar{x} \pm sd$) | 6,80 \pm 0,03 ^a | 13,80 \pm 0,03 ^b | 7,20 \pm 0,03 ^a | 13,70 \pm 0,06 ^b |
| Defeitos Totais ($\bar{x} \pm sd$) | 10,00 \pm 0,05 ^a | 24,50 \pm 0,04 ^b | 10,00 \pm 0,04 ^a | 23,80 \pm 0,07 ^b |

^{a,b} Valores médios seguidos de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

A porcentagem de anormalidades espermáticas para os grupos estudados de acordo com a classificação de Blom (1973) estão descritos ao lado (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios (\bar{x}) e erro padrão (se) da porcentagem das anormalidades espermáticas para as subespécies *B. taurus* e *B. indicus* antes e após a criopreservação, Araçatuba, SP, 2015

| | Defeitos | <i>Bos taurus</i> | | <i>Bos indicus</i> | |
|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | | Sêmen Fresco | Sêmen Congelado | Sêmen Fresco | Sêmen Congelado |
| Defeitos maiores | Acrossoma | 0,10±0,10 | 3,10±0,75 | 0,2±0,13 | 1,9±0,48 |
| | Gota citoplasmática proximal | 1,40±0,40 | 0,90±0,31 | 0,90±0,31 | 0,80±0,33 |
| | Subdesenvolvida | | | | 0,20±0,13 |
| | Enrolada na cabeça | 0,50±0,22 | 0,70±0,21 | 0,20±0,13 | 0,30±0,15 |
| | Isolada patológica | | 0,20±0,13 | | 0,30±0,15 |
| | Estreita na base | 0,10±0,10 | 0,50±0,31 | | 0,40±0,22 |
| | Piriforme | 0,10±0,10 | 0,70±0,26 | 0,10±0,10 | 0,80±0,36 |
| | Pequena anormal | | | | |
| | Contorno anormal | | 0,50±0,17 | | 1,00±0,30 |
| | “Pouch formation” | | 1,60±0,40 | | 1,10±0,31 |
| | Formas duplas | | 0,10±0,10 | 0,10±0,10 | 0,20±0,13 |
| | Defeitos de membrana | 0,10±0,10 | 0,90±0,28 | 0,30±0,21 | 0,90±0,59 |
| | Peça intermediária | 0,20±0,13 | 0,20±0,13 | 0,40±0,22 | 0,20±0,13 |
| | Cauda fortemente enrolada | 0,70±0,26 | 1,30±0,30 | 0,60±0,22 | 2,00±0,83 |
| Total de defeitos maiores | | 3,2 | 10,7 | 2,8 | 10,1 |
| Defeitos menores | Pequena, delgada ou gigante | 0,10±0,10 | 1,20±0,38 | 0,20±0,20 | 1,20±0,25 |
| | Decaptação | 0,10±0,10 | 1,30±0,30 | 0,50±0,22 | 3,20±0,63 |
| | Peça intermediária abaxial | 0,10±0,10 | 0,70±0,39 | 0,20±0,13 | 0,40±0,22 |
| | Cauda dobrada | 3,10±0,59 | 7,40±1,14 | 2,60±0,48 | 6,70±1,45 |
| | Gota citoplasmática distal | 2,40±0,86 | 1,40±0,48 | 2,30±0,72 | 1,20±0,33 |
| | Cauda dobrada com gota | 1,00±0,30 | 1,80±0,59 | 1,40±0,37 | 1,00±0,33 |
| Total de defeitos menores | | 6,8 | 13,8 | 7,2 | 13,7 |
| Total | | 10 | 24,5 | 10 | 23,8 |

5.2 Avaliação de acrossoma, membrana plasmática e peroxidação lipídica

Os espermatozoides de amostras frescas mostraram diferença ($p < 0,05$) nos testes de PI, HIPO e TBARS, sendo notada melhor qualidade do sêmen *in natura* em todos os testes. O teste para acrossoma (FITC-PSA) mostrou aumento no número de células com membrana reativa ($p < 0,05$) entre o sêmen *in natura* e descongelado no grupo *B. taurus*. No teste HIPO houve diferença entre as subespécies após o descongelamento do sêmen, mostrando uma melhor qualidade do sêmen de animais de origem europeia. Não foi encontrada diferença ($p > 0,05$) entre as subespécies nos demais testes (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (sd) das variáveis membrana plasmática lesada pelo teste do PI (%) e HIPO (%), acrossoma lesado pelo teste do FITC-PSI (%) e peroxidação lipídica (ng/ml) pelo teste TBARS de touros *B. taurus* e *B. indicus* antes e após a criopreservação e descongelamento, Araçatuba, SP, 2015.

| Grupos | <i>Bos taurus</i> | | <i>Bos indicus</i> | |
|-----------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Sêmen Fresco | Sêmen Congelado | Sêmen Fresco | Sêmen Congelado |
| PI | 39,7±11,26 ^a | 63,2±7,98 ^b | 35,6±11,59 ^a | 62,3±7,58 ^b |
| FITC-PSA | 23,7±3,62 ^a | 32,9±7,34 ^b | 26,4±8,57 ^{ab} | 32,6±6,67 ^b |
| HIPO | 20,6±9,19 ^a | 59,6±6,45 ^b | 27,1±9,57 ^a | 72,5±6,98 ^c |
| TBARS | 387,8±97,29 ^a | 685,3±142,05 ^b | 425,9±129,38 ^a | 696,4±139,99 ^b |

^{a,b,c} Valores médios seguidos de letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

5.3 Avaliação da condensação da cromatina e morfometria da cabeça espermática com Azul de Toluidina

Comprimento, Fourier 0, simetria lateral e simetria ântero-posterior não mostraram nenhuma diferença ($p > 0,05$) dentro das raças, processo de criopreservação e interação entre os mesmos. Área, perímetro, largura/comprimento, elipsidade, fator forma, Fourier 2 tiveram diferença ($p < 0,05$) entre o sêmen *in natura* e descongelado nos animais zebuínos e também entre as raças no sêmen criopreservado, exceção para o fator forma onde a diferença entre as subespécies foi para o sêmen *in natura*. Largura mostrou diferença ($p < 0,05$) entre as subespécies nos dois momentos e também entre o sêmen *in natura* e descongelado dentro de cada grupo. A medida Fourier 1, a descompactação da cromatina e a heterogeneidade

mostraram diferença ($p < 0,05$) entre o sêmen *in natura* e descongelado nos animais *B. taurus* e *B. indicus*, mas não teve diferença entre as raças, com exceção da heterogeneidade onde o sêmen descongelado teve diferença ($p < 0,05$) entre as duas subespécies.

Tabela 5. Média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) das variáveis morfométricas da cabeça, descompactação e heterogeneidade da cromatina de espermatozoides de touros *B. taurus* (10) e *B. indicus* (10) de amostras de sêmen fresco e após o congelamento e descongelamento, avaliados pela técnica do Azul de Toluidina, Araçatuba, SP, 2015.

| Grupos | <i>Bos taurus</i> | | <i>Bos indicus</i> | |
|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Sêmen Fresco | Sêmen Congelado | Sêmen Fresco | Sêmen Congelado |
| Área | 11469,68±2325,824 ^a | 11556,14±2055,462 ^a | 11885,19±2270,539 ^a | 12416,06±2232,059 ^b |
| Perímetro | 25,05±2,164 ^a | 25,17±1,866 ^a | 25,51±2,072 ^a | 26,02±2,018 ^b |
| Largura | 5,34±1,205 ^a | 5,22±0,963 ^b | 5,22±0,969 ^b | 5,31±0,978 ^a |
| Comprimento | 7,49±0,679 | 7,53±0,588 | 7,64±0,635 | 7,72±0,616 |
| Largura/Comprimento | 0,69±0,161 ^a | 0,68±0,158 ^a | 0,68±0,159 ^a | 0,70±0,152 ^b |
| Elipsidade | 0,20±0,112 ^a | 0,20±0,110 ^a | 0,20±0,111 ^a | 0,19±0,104 ^b |
| Fator Forma | 1,07±0,102 ^a | 1,07±0,100 ^a | 1,06±0,101 ^b | 1,07±0,097 ^a |
| Fourier 0 | 12105,91±6425,938 | 12239,66±6243,515 | 12638,93±6482,018 | 12459,63±6428,334 |
| Fourier 1 | 16,53±9,986 ^a | 17,31±10,451 ^b | 16,86±9,900 ^a | 17,26±10,328 ^b |
| Fourier 2 | 7807,48±2116,410 ^a | 7867,27±1965,469 ^a | 8091,96±2108,365 ^a | 8536,77±2058,209 ^b |
| Simetria lateral | 1,00±0,00 | 1,00±0,00 | 1,00±0,00 | 1,00±0,00 |
| Simetria ântero-posterior | 0,99±0,001 | 0,99±0,000 | 0,99±0,000 | 0,99±0,000 |
| Descompactação da cromatina | 2,05±1,500 ^a | 2,57±1,751 ^b | 2,09±1,382 ^a | 2,59±1,708 ^b |
| Heterogeneidade da cromatina | 1,73±0,649 ^a | 2,48±0,973 ^b | 1,69±0,493 ^a | 2,14±0,697 ^c |

^{a,b,c,d} Valores médios seguidas de letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Sabe-se que a criopreservação causa danos aos espermatozoides e injúrias aparentemente menores podem abolir completamente a fertilidade de uma célula espermática (HOLT, 2000). No presente estudo observamos que a criopreservação afeta a motilidade, vigor, função bioquímica e integridade física da membrana plasmática, acrossoma, descompactação da cromatina e causa aumento da peroxidação lipídica em ambas as subespécies estudadas. A subespécie *Bos taurus* apresentou melhor motilidade antes e após descongelamento do sêmen, considerando as outras características analisadas não houve diferença entre as subespécies no sêmen *in natura*. Animais de origem europeia mostraram melhor qualidade do sêmen descongelado, com resultados superiores na motilidade, HIPO e morfometria do espermatozoide, mostrando-se melhor adaptados ao processo de criopreservação que animais zebuínos.

Os valores de motilidade observados entre o sêmen *in natura* e descongelado apresentados em nosso trabalho corroboram com outros autores (O'CONNELL et al., 2002; CELEGHINI et al., 2008; DEFOIN et al., 2008). A diminuição do vigor e quantidade de células móveis ocorre, pois estruturas que garantem sua sobrevivência, como membrana plasmática e estruturas do flagelo, são afetadas pelo processo de criopreservação (CELEGHINI et al., 2008).

A motilidade entre as duas subespécies é diferente dos valores demonstrados em outras pesquisas (BRITO et al., 2002; KOIVISTO et al., 2009), os quais realizaram a análise apenas no sêmen *in natura* e não observaram diferença entre as subespécies. Os resultados obtidos por ANCHIETA et al. (2005), são semelhantes aos encontrados em nosso estudo, mostrando valores superiores de motilidade para animais *B. taurus*.

O vigor entre as subespécies não mostrou diferença, tanto antes como após a criopreservação. Na literatura existem resultados controversos, mostrando que não há diferença do vigor entre animais *B. taurus* e *B. indicus* enquanto outros afirmam a diferença (ANCHIETA et al., 2005; KOIVISTO et al., 2009).

Motilidade e vigor são variáveis de eficácia discutida para prever a fertilidade quando utilizadas isoladamente, pois sua correlação com diferentes índices de fertilidade apresenta grandes variações. Na análise visual da motilidade, o nível de correlação pode variar entre 0,15 a 0,83 (JANUSKAUSKAS et al., 2003). Essa

diferença ocorre devido à baixa acurácia, imprecisão e subjetividade do método visual utilizado (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Mas quando a motilidade e vigor espermáticos são analisados em conjunto com outras técnicas laboratoriais, são parâmetros importantes na avaliação seminal (SMITH et al., 1981).

No sêmen bovino, a morfologia é avaliada por meio do sistema idealizado por BLOM (1973), classificando as anormalidades como defeitos maiores e menores, levando em consideração alterações espermáticas em relação à fertilidade.

Em nosso estudo, observou-se aumento de espermatozoides com morfologia anormal após a criopreservação, com destaque para defeitos de acrossoma, mudanças essas já relatadas (O'CONNELL et al., 2002; CELEGHINI et al., 2008). O acrossoma pode ser danificado durante o processo de criopreservação desde o arrefecimento até a descongelação (AMANN & PICKETT, 1987, WATSON, 1995). Porcentagens maiores de defeitos de acrossoma podem ser encontradas na literatura, quando comparados ao presente trabalho, podendo ser explicado ao uso de diferentes diluidores (CELEGHINI et al., 2008).

Não houve diferença de defeitos maiores, menores e totais entre as duas subespécies estudadas, corroborando com estudo de BRITO et al. (2002) e diferente de outras pesquisas, onde *B. taurus* apresentaram valores distintos em relação aos *B. indicus*. Em experimento animais taurinos mostraram maior porcentagem de defeitos maiores no verão (NICHI, 2003), já no outro, animais de origem europeia apresentaram valores superiores de defeitos maiores durante todas estações do ano (KOIVISTO et al., 2009). A diferença em relação aos outros estudos pode ter ocorrido devido ao tipo de regime de criação dos animais de nosso estudo (semiextensivo) além dos animais serem coletados duas vezes por semana pelo método de vagina artificial.

A porcentagem de células com membrana plasmática intacta no sêmen descongelado foi semelhante ao número de células móveis, confirmando que lesões da membrana podem causar a morte das células espermáticas impedindo a fertilização do oócito. A criopreservação causou drástica diminuição na quantidade de células com a membrana plasmática intacta, corroborando com outras pesquisas, que inclusive apresentaram maior taxa de células danificadas (ARRUDA et al., 2005; CELEGHINI et al., 2008; FORERO-GONZALEZ et al., 2012).

Não houve diferença significativa entre as subespécies em relação aos danos da membrana plasmática tanto para o sêmen *in natura* quanto para o descongelado,

demonstrando igual qualidade e resistência da membrana. No sêmen descongelado as lesões de membrana foram inferiores nas duas subespécies quando comparados à pesquisa anterior (RODRIGUES, 2009). Estes resultados indicam que a temperatura já não altera essa característica da célula espermática entre as subespécies, sugerindo que animais *B. taurus* estão melhor adaptados ao clima subtropical.

O teste hiposmótico baseia-se no transporte de água através da membrana plasmática avaliando sua integridade bioquímica (VERA-MUNOZ et al., 2009). Neste experimento, a porcentagem de células viáveis pelo HIPO, foi muito próxima do número de células móveis após descongelamento do sêmen, comprovando sua eficiência, além de ter correlação positiva com índices de fertilidade *in vivo* (BRITO et al., 2003). Após o descongelamento, animais *B. taurus* apresentaram maior porcentagem de células com integridade bioquímica, indicando melhor resistência do espermatozoide. Resultado semelhante foi relatado nos zebuínos, utilizando ejaculado de animais cruzados (*B. taurus* x *B. indicus*), com extensor a base de LDL 8% (VERA-MUNOZ et al., 2009).

O número de células com acrossoma danificado após o descongelamento, corrobora com estudo anterior (CELEGHINI et al., 2008), onde também não foram encontradas diferenças entre as subespécies. Pesquisa mais recente, utilizando meio diluidor e crioprotetores diferentes, apresentou valores maiores de células com acrossoma lesado (FORERO-GONZALEZ et al., 2012). A avaliação do acrossoma utilizando a sonda fluorescente FITC-PSA, foi mais eficiente quando comparada com a microscopia de contraste de interferência diferencial.

O sêmen de *B. indicus* mostrou menor porcentagem de células que sofreram danos no acrossoma durante processo de criopreservação, apresentando maior resistência em relação aos desafios impostos pela técnica de criopreservação. Essa resistência pode ter sido adquirida devido à grande seleção genética que foi e ainda é feita nos animais utilizados como reprodutores.

Na peroxidação lipídica as subespécies não tiveram diferença estatística ($p > 0,05$) entre si, tanto no sêmen *in natura* quanto descongelado, embora a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico tenha sido numericamente maior nos dois momentos para animais *B. indicus*. Notou-se correlação negativa entre a produção de TBARS e a motilidade, também evidenciado por outros pesquisadores (BEORLEGUI et al., 1997). Em experimento realizado por RODRIGUES (2009) que

analisou sêmen criopreservado de animais taurinos e zebuínos no verão e inverno, também não foi observada diferença entre as subespécies.

Somente após descongelamento a morfometria da cabeça do espermatozoide dos zebuínos apresentou valores significativamente maiores, diferindo de outras pesquisas, onde animais de origem europeia mostraram medidas superiores (BELETTI et al., 2005a). O processo de criopreservação altera a morfometria espermática (GRAVANCE et al., 1998; RUBIO-GUILLÉN et al., 2007), evidenciado até pelo aumento numérico dos parâmetros morfométricos nos animais *B. taurus* em nosso estudo. A variável Fourier 2 (F2), foi estatisticamente maior no sêmen descongelado de animais *B. indicus*, apesar de também ter aumentado nos animais *B. taurus*. Ela mede o comprimento do núcleo espermático indicando micro ou macrocefalia (OSTERMEIER et al., 2001). Touros com fertilidade reduzida já foram identificados com um maior comprimento de F2, apresentando acurácia de 95% para prever a infertilidade dos machos (PARRISH et al., 2012).

A estabilidade estrutural da cromatina espermática é fundamental para o processo de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (D'OCCHIO et al., 2007), exaltando a importância da avaliação da integridade do DNA do espermatozoide. Embora a cromatina espermática de bovinos apresente pequena alteração após processo de criopreservação (SLOWINSKA et al., 2008), o presente estudo mostra aumento significativo da descompactação da cromatina no sêmen descongelado, causada por provável perda de protaminas do núcleo da célula. Entre as subespécies não houve diferença significativa ($p > 0,05$), corroborando com pesquisa anterior (RODRIGUES, 2009).

Alterações da cromatina são comumente acompanhadas de anormalidades morfológicas, como cabeça piriforme, estreita na base, decapitada anormal e cabeça gigante ou delgada (ENCISO et al., 2011). A condensação do DNA, além de proteger o material genético, determina a forma e tamanho da célula (BALHORN, 2011) e sua composição proteica é adquirida durante a espermatogênese (ZINI et al., 2009). No epidídimo onde se originam os defeitos secundários, ocorre a compactação final da cromatina, dessa forma a compactação do DNA pode ser afetada por defeitos morfológicos (BELETTI & MELLO et al., 2004).

Nossos resultados sugerem que anormalidades na compactação da cromatina podem refletir na morfometria das células, aumentando suas dimensões, podendo ser acompanhadas de alterações morfológicas. Dessa forma enfatiza-se a importância da

análise do DNA espermático para aperfeiçoar biotécnicas da reprodução (BELETTI et al., 2005b; ENCISO et al., 2011).

7. CONCLUSÃO

No presente estudo conclui-se que após o processo de criopreservação e descongelamento do sêmen, animais taurinos apresentaram melhor congelabilidade. Pois tiveram menor queda de motilidade, atividade bioquímica da membrana plasmática e menores alterações das variáveis morfométricas (área, perímetro, largura, comprimento e F2).

Em relação às amostras de sêmen *in natura*, notou-se diferença entre as subespécies apenas na motilidade, que teve maior valor nos animais *B. taurus*.

8. REFERÊNCIAS

Aitken, R.J.; Baker, M.A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 16, p. 66-69, 2006.

Aitken, R.J.; Buckingham, D.; Harkiss, D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97 p. 441-450, 1993.

Alun-Jones, W. Abnormal morphology of the spermatozoa in Guernsey bulls. **British Veterinary Journal**, v. 118, p. 257-261, 1962.

Alvarez, J.G.; Storey, B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 334-346, 1995.

Amann, R.P.; Pickett, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.

Anchieta, M.C.; Vale Filho, V.R.; Colosimo, E.; Sampaio, I.B.M.; Andrade, V.J. Descarte e congelabilidade do sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 196-204, 2005.

Aoki, V.W.; Moskovtsev, S.I.; Willis, J.; Liu, L.; Mullen, J.B.M.; Carrell, D.T. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. **Journal of Andrology**, v. 26, p. 741-748, 2005.

Arruda, R.P.; Ball, B.A.; Gravance, C.G.; Liu, I.K.M. Flow cytometric membrane and acrosomal integrity of the stallion spermatozoa. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 226-227, 2003.

Arruda, R.P.; Celeghini, E.C.C. Validação de técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 230-231, 2003.

Arruda, R.P.; Forero-Gonzalez, R.A.; Celeghini, E.C.C.; Raphael, C.F. Effects of cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotectants on plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes of bovine spermatozoa. **Acta Science Veterinariae**, v. 33, p. 329, 2005.

ASBIA - **Associação Brasileira de Inseminação Artificial**. Disponível em: www.asbia.org.br . Acessado em: 23 de janeiro de 2014.

Balhorn, R.; Brewer, L.; Corzett, M. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. **Molecular Reproduction and Development**, v. 56, p. 230-234, 2000.

BALHORN, R. Sperm Chromatin: an overview. In: ZINI, A. & AGARWAL, A. **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1^a ed., USA, Springer, Cap. 1, p. 3-18, 2011.

Ball, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 257-267, 2008.

Barth, A.D.; Bowman, P.A.; Bow, G.A.; Mapletoft, R.J. Effect of narrow sperm head shape on fertility in cattle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 33, p. 31-39, 1992.

Barth, A.D.; Oko, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. **Ames: Iowa State University Press**, v. 1, p. 285, 1989.

Beletti, M.E.; Costa, L.F. A systematic approach to multi-species sperm morphometrical characterization. **Analytical & Quantitative Cytology & Histology**, v. 25, p. 97-107, 2003.

Beletti, M.E.; Costa, L.F.; Guardieiro, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphology Science**, v. 22, p. 85-90, 2005b.

Beletti, M.E.; Costa, L.F.; Viana, M.P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos Taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 105-116, 2005a.

Beorlegui, N.; Cetica, P.; Trincherro, G.; Córdoba, M.; Beconi, M. Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. **Andrologia**, v. 29, p. 37-42, 1997.

Blom, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, v. 25, p. 383-391, 1973.

Brewer, L.; Corzett, M.; Balhorn, R. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 38895-38900, 2002.

Brito, L.F.C.; Barth, A.D.; Bilodeau-Goeseels, S.; Panich, P.L.; Kastelic, J.P. 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.

Brito, L.F.C.; Silva, A.E.D.F.; Rodrigues, L.H.; Vierira, F.V.; Deragon, L.A.G.; Kastelic, J.P. Effect of age genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. **Theriogenology**, v. 58, p. 1175-1186, 2002.

Bucak, M.N.; Sariözkan, S.; Tuncer, P.B.; Sakin, F.; Atessahin, A.; Kulaksiz, R.; Çevik, M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircusancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 24-30, 2010.

Buege, J.A; Austin, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzimology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

Carreira, J.T.; Mingoti, G.Z.; Rodrigues, L.H.; Silva, C.; Perri, S.H.V.; Koivisto, M.B. Impact of proximal cytoplasmic droplets on quality traits and *in-vitro* embryo production efficiency of cryopreserved bull spermatozoa. **Acta Veterinária Scandinavica**, v. 54, p.1, 2012.

Cartwright, T.C. Responses of beef cattle to high ambient temperatures. **Journal of Animal Science**, v. 14, p. 350-362, 1995.

Casey, P.J.; Hillman, R.B.; Robertson, K.R.; Yudin, A.I.; Liu, I.K.M.; Drobnis, E.Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 289-297, 1993.

Celeghini, E.C.C.; Arruda, R.P.; De Andrade, A.F.C.; Nascimento, J.; Raphael, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.

Celeghini, E.C.C.; Arruda, R.P.; De Andrade, A.F.C.; Nascimento, J.; Raphael, C.F.; Rodrigues, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 119-131, 2008.

Cheng, F.P.; Fazeli, A.; Voorhout, W.F.; Marks, A.; Bevers, M.M.; Colenbrander, B. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 674-682, 1996.

Correa, J.R.; Heersche, G.; Zavos, P.M. Sperm membrane functional integrity and response of frozen thawed bovine spermatozoa during the swelling test incubation at varying temperatures. **Theriogenology**, v. 47, p. 715-729, 1997a.

Correa, J.R.; Pace, MM.; Zavos, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, p. 721-731, 1997b.

Cross, N.L.; Morales, P.; Overstreet, J.W.; Hanson, F.W. Two simple methods for detecting acrosome - reacted human sperm. **Gamete Research**. v. 15, p. 213-226, 1986.

Curry, M.R.; Watson, P.F. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. **Cryobiology**, v. 31, p. 36-49, 1994.

Defoin, L.; Granados, A.; Donnay, I. Analysing motility parameters on fresh Bull semen could help to predict resistance to freezing: A preliminary study. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 606-611, 2008.

De Lamirande, E; Gagnon, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v. 10, p. 15–21, 1995.

Devireddy, R.V.; Swanlund, D.J.; Olin, T.; Vincente, W.; Troedsson, M.H.; Bischof, J.C.; Roberts, K.P. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 222-231, 2002.

D'Occhio, M.J.; Hengstberger, K.J.; Johnston, S.D. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 1-17, 2007

Enciso, M.; Cisale, H.; Johnston, S.D.; Sarasa, J.; Fernández, J.L.; Gonsálvez, J. Major morphological abnormalities in the Bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v. 26, p. 23-32, 2011.

Esteves, S.C.; Sharma, R.K.; Thomas Jr., A.J.; Agarwal, A. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 33, p. 364-376, 2007.

Felius, M. **Genus Bos: Cattle Breeds of the World**, MSD-AGVET Division of Merck and Co. Rahway, p. 235, 1985.

Flesch, F.M.; Gadella, B.M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

Forero-Gonzalez, R.A.; Celeghini, E.C.C.; Raphael, C.F.; Andrade, A.F.C.; Bressan, F.F.; Arruda, R.P. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Andrologia**, v. 44, p. 154-159, 2012.

Fraser, L.; Strzezek, J. Effect of different procedures of ejaculate collection extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 317–329, 2007.

Fuentes-Mascorro, G.; Serrano, H.; Rosado, A. Sperm chromatin. **Archives of Andrology**, v. 45, p. 215-225, 2000.

Gandini, L; Lombardo, F; Lenzi, A; Spano, M; Dondero, F. Cryopreservation and sperm DNA integrity. **Cell Tissue Banking**, v. 7, p. 91-98, 2006.

Gao, D.; Mazur, P.; Critser, J.K. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow, A.M.; Critser, J.K. (Eds.), **Reproductive Tissue Banding**: Scientific Principles. Academic Press, San Diego, p. 263–328, 1997.

Gao, D.Y.; Liu, J.; Liu, C.; McGann, L.E.; Watson, P.F.; Kleinhans, F.W; Mazur, P.; Critser, E.S.; Critser, J.K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Human Reproduction**, v. 10, p. 1109-1122, 1995.

Garrett, C.; Baker, H.W. A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. **Fertility and Sterility**, v. 63, p. 1306-1317, 1995.

Gillan, L.; Maxwell, W.M. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 271-283, 1999.

Gonzalez, R.A.F. **Efeito da criopreservação utilizando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e integridade de membranas do espermatozoide bovino**. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo. Pirassununga. 94p, 2004.

Hafez, E.S.E. & Hafez, B. **Reprodução Animal**, 7 ed. Barueri: Manole, 2004.

Hammadeh, M.E.; Askari, A.S.; Georg, T.; Rosembaum, P.; Schmidt, W. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and sub-fertile men. **International Journal of Andrology**, v. 22, p. 155-162, 1999.

Holden, C.A.; Hyne, R.V.; Sathananthan, A.H.; Trounson, A.O. Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, p. 247-257, 1990.

Holt, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>, acessado em 20 de abril de 2015.

Januskauskas, A.; Haard, M.G.; Haard, M.C.; Soderquist, K.; Lundeheim, N.; Rodriguez-martinez, H. Estimation of sperm viability in frozen-thawed semen from Swedish A.I. bulls. **Zentralbl Veterinarmed A**, v. 43, p. 281-287, 1996.

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**, v. 55, p. 947-961, 2001.

Januskauskas, A.; Johannisson, 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.

Johnson, H.D. Environmental temperature and lactation (with special reference to cattle). **International Journal of Biometeorology**, v. 9, p. 103-116, 1965.

Katkov, I.I.; Katkova, N.; Critser, J.K.; Mazur, P. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. **Cryobiology**, v. 37, p. 325-338, 1998.

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 in Domestic Animals**, v. 44, p. 587-592, 2009.

Koivisto, M.B.; Pavão, D.L.; Piccolomini, M.M.; Alves, M.F.; Souza, A.H.; Carreira, J.T.; D Angelo, M. Effects of spermatozoa containing abaxial tail attachment during in vitro embryo production (IVP) – preliminary results. In: **8th International Ruminant Reproduction**. *Reproduction in Domestic Ruminants VII*, v. 7, p. 503-503, 2010.

Kumar, D.; Kumar, P.; Singh, P.; Yadav, S.P.; Sarkar, S.K.; Bharadwaj, A.; Yadav, P.S. Characteristics of frozen thawed semen in predicting the fertility of buffalo bulls. **Indian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 389-392, 2014.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal>. Acessado em 20 de abril de 2015.

Martins, L.F.; Pinho, R.O.; Paraizo, R.M.; Oliveira, R.R.; Castilho, E.F.; Guimarães, J.D. Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen de touros Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1519-1525, 2011.

Medeiros, C.M.; Forell, F.; Oliveira, A.T.; Rodrigues, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327–344, 2002.

Mello, M.I.V.; Henry, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 77-78, 1999.

Mendoza, C.; Carreras, A.; Moss, J.; Tesarik, J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 755–763, 1992.

Menkveld, R.; Holleboom, C.A.G.; Rhemrev, J.P.T. Measurement and significance of sperm morphology. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 59-68, 2011.

Meyers, S.A. CHAPTER 43 – Advanced Semen Tests for Stallions. **Current Therapy in Equine Reproduction**, p. 275-280, 2007.

Morani, C.S.E. **Quantificação dos radicais livres produzidos nas diferentes etapas do processo de criopreservação do sêmen de touros**. Tese de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Brasil, p. 15-17, 2004.

Mortimer, R.G.; Seidel Jr., G.E.; Amann, R.P.; Grotelueschen, D.M.; Olson, S.E. Use of in vitro fertilization to evaluate spermatozoa with proximal droplets in young beef bulls. **Theriogenology**, v. 54, p. 247, 1991.

Nagy, S.; Jansen, J.; Topper, E.K.; Gadella, B.M. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biology of Reproduction**; v. 68, p. 1828-1835, 2003.

Neild, D.M.; Gadella, B.M.; Chaves, M.G.; Miragaya, M.H.; Colenbrander, B.; Agüero, A. Membrane changes during different stages of a freeze thaw protocol for equine semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 59, p. 1693–1705, 2003.

Nichi, M.; Bols, P.E.J.; Züge, R.M.; Barnabe, V.H.; Goovaerts, I.G.F.; Barnabe, R.C.; Cortada, C.N.M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, p. 822-828, 2006.

Nichi, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Brasil, p. 103, 2003.

Nikolettos, N.; Kupker, W.; Demirel, C.; Schooper, B.; Blasig, G.; Sturm, R.; Felberbaum, R.; Bauer, O.; Diedrick, K.; AL-Hasani, S. Fertilization potential of spermatozoa with abnormal morphology. **Human Reproduction**, v. 14, p. 47-70, 1999.

Nordberg, J.; Arnér, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

O'Connell, M.; McClure, N.; Lewis, S.E.M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, p. 704-709, 2002.

O'Flaherty, C.; Beconi, M.; Beorlegui, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen–thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 29, p. 269–275, 1997.

Ohashi, O.M.; Sousa, J.S.; Ribeiro, H.F.L.; Vale, W.G. Distúrbios reprodutivos em touros *Bos indicus*, *B. taurus* e mestiços criados em clima amazônico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, p. 31-35, 1988.

Oliveira, L.Z.; Arruda, R.P.; Andrade, A.F.C.; Celeghini, E.C.C.; Santos, R.M.; Beletti, M.E.; Peres, R.F.G.; Oliveira, C.S.; Hossepian de Lima, V.F.M. Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. **Livestock Science**, v. 146, p. 38–46, 2012.

Ostermeier, G.C.; Sargeant, G.A.; Yandell, B.S.; Evenson, D.P.; Parrish, J.J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 595-603, 2001.

Ōura, C.; Toshimori, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v. 122, p. 105-151, 1990.

Parent, S.; Lefievre, L.; Brindle, Y.; Sullivan, R. Bull subfertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen. **Molecular Reproduction and Development**, v. 52, p. 57–65, 1999.

Parrish, J.J.; Schindler, J.; Willenburg, K.; Enwall, L. Quantitative sperm shape analysis: what can this tell us about male fertility. **Proceedings of the 24th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction**, p. 74-80, 2012.

Pesch, S.; Bergman, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v. 37, p. 597-612, 2006.

Pintado, B.; de la Fuente, J.; Roldan, E. R. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, p. 145-152, 2000.

Prathalingam, N.S.; Holt, W.V.; Revell, S.G.; Jones, S.; Watson, P.F. Dilution of spermatozoa results in improved viability following a 24h storage period but decreased acrosome integrity following cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p. 11-22, 2006.

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

Rocha, A.; Randel, R.D.; Broussard, J.R.; Lim, J.M.; Blair, R.M.; Roussel, J.D.; Godke, R.A.; Hansel, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 657-665, 1998.

Rodrigues, MP. **Perfil oxidativo e avaliação funcional de semen criopreservado de touros (*Bos taurus Taurus* e *Bos Taurus indicus*) criados em clima tropical**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, p. 145, 2009.

Rota, A.; Penzo, N.; Vincenti, L.; Mantovani, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1415-1420, 2000.

Rubio-Guillén, J.; González, D; Garde, J.J.; Estesó, M.C.; Fernández-Santos, M.R.; Rodríguez-Gil, J.E.; Madrid-Bury, N.; Quintero-Moreno, A. Effects of Cryopreservation on Bull Spermatozoa Distribution in Morphometrically Distinct Subpopulations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 354-357, 2007.

Sanocka, D.; Kurpisz, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 12-26, 2004.

Seli, E.; Gardner, D.K.; Schoolcraft, W.B.; Moffatt, O.; Sakkas, D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 82, p. 378-383, 2004.

Slowinska, M.; Karol, H.; Ciereszko, A. Comet assay of fresh and cryopreserved bull spermatozoa. **Cryobiology**, v. 56, p. 100-102, 2008.

Smith, M.F.; Morris, D.L.; Amoss, M.S.; Parish, P.; Willians, J.D.; Wiltbank, J.N. Relationship among fertility, scrotal circumference, seminal quality and libido in Santa Gertrudis bulls. **Theriogenology**, v.16, p. 379, 1981.

Sudano, M.J.; Crespilho, A.M.; Fernandes, C.B.; Martins Junior, A.; Papa, F.O.; Rodrigues, J.; Machado, R.; Landim-Alvarenga, F.C. Use of bayesian inference to correlate in vitro embryo production and in vivo fertility in Zebu bulls. **Veterinary Medicine International**; v. 2011, p. 1-6, 2011.

Tasdemir, I.; Tasdemir, M.; Tavukcuoglu, S; Kahraman, S.; Biberoglu, K. Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intra-cytoplasmic sperm injection in humans. **Human Reproduction**, v. 12, p. 1214-1217, 1997.

Thundathil, J.C.; Dance, A.L.; Rahamanickam, G.D.; Kastelic, J.P. Evaluation of bovine sperm morphology. **24th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction**, p. 86-93, 2012.

Thundathil, J.; Meyer, R.; Palasz, A.T.; Barth, A.D.; Mapletoft, R.J. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm in IVF and embryo production. **Theriogenology**, v. 54, p. 921-934, 2000.

Thundathil, J.; Palasz, A.T.; Mapletoft, R.J.; Barth, A.D. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 57, p. 35-50, 1999.

Vera-Munoz, O.; Amirat-Briand, L.; Diaz, T.; Vásquez, L.; Schmidt, E.; Desherces, S.; Anton, M.; Bencharif, D.; Tainturier, D. Effect of sêmen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovinespermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl® and Bioxcell®. **Theriogenology**, v. 71, p. 895-900, 2009.

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

Watson, P.F.; Duncan, A.E. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. **Cryobiology**, v. 25, p. 131-42, 1988.

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

Watson, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. **Effects of Low Temperatures on Biological Membranes**. Academic Press, London, p. 189, 1981.

Zini, A.; Phillips, S.; Courchesne, A.; Boman, J.M.; Baazeem, A.; Bissonnette, F.; Kadoch, I.J.; Gabriel, M.S. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. **Fertility and Sterility**, v. 91, p. 2495-2500, 2009.