

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DO MEIO DILUIDOR E DA DOSE INSEMINANTE SOBRE A
CONGELABILIDADE E FERTILIDADE DO SÊMEN BOVINO UTILIZADO EM
PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO-FIXO (IATF)**

ANDRÉ MACIEL CRESPILO

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária (Área de Concentração: Reprodução Animal), como parte das exigências para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu - SP
Fevereiro - 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Crespilho, André Maciel.

Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo-fixado (IATF) / André Maciel Crespilho. – Botucatu : [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Assunto CAPES: 50504002

1. Bovino - Reprodução 2. Inseminação artificial

CDD 636.2.08246

Palavras-chave: Congelabilidade espermática, Criopreservação; Diluidor; Dose inseminante; Inseminação artificial em tempo-fixado; Sêmen bovino.

DEDICATÓRIA

Essa dissertação é dedicada aos meus pais José Célio Crespilho e Silvia Helena Maciel Crespilho pelo amor, exemplo de vida e pela luta constante em prol da minha formação e educação. Todas as conquistas do passado, presente e futuro pertencem a eles!

A Fernanda Carpi dos Santos pelo amor, dedicação, incentivo e paciência durante todos esses anos: sem dúvida você é minha maior vitória!

Aos meus irmãos Daniel Maciel Crespilho e Eduardo Maciel Crespilho pela amizade, incentivo e pelas risadas proporcionadas por nossa convivência.

A Deus que por seu amor e sua graça me guiou até aqui.

Qualquer um pode chegar a imortalidade.....

Basta fazer apenas uma coisa notável!

KEEP WALKING

(Informe publicitário veiculado por John Walker and Sons Ltda, London/UK)

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Titular Frederico Ozanam Papa pelos ensinamentos inestimáveis, exemplo de ética, postura, profissionalismo e amizade. Muito obrigado por acreditar em meu trabalho e minhas idéias.
- A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu pela oportunidade de ingresso na pós-graduação.
- A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, berço de minha formação e responsável por todos os meus avanços profissionais.
- A FAPESP pela bolsa de estudo e auxílio financeiro para execução do projeto de pesquisa.
- Ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ-UNESP Campus de Botucatu/SP por disponibilizar sua estrutura para o desenvolvimento do trabalho.
- A pós-graduação da FMVZ-UNESP Botucatu/SP, em nome de todos os seus funcionários pelo grande apoio e auxílio para concretização dessa dissertação.
- Ao Professor Alicio Martins Júnior pela amizade, confiança e incentivo desde os tempos da graduação.
- Aos Professores Maria Denise Lopes, João Carlos Pinheiro Ferreira e Cezinande de Meira pelo grande apoio, amizade, ensinamentos e conselhos ao longo dos últimos anos.
- Ao Professor José Luis Moraes Vasconcelos pela amizade, ensinamentos e motivação para realização dos trabalhos de pesquisa.

- Aos Professores Francisco Stefano Wechsler, Luzia Aparecida Trinca, José Luis Moraes Vasconcelos e ao doutorando José Luis Costa Novaes pela paciência e prestatividade nas orientações estatísticas.
- Aos grandes amigos de república José Luis (Zé do Peixe) e Eduardo Hatchback (Dú) por toda ajuda, incentivo e companheirismo ao longo dos anos.
- Aos grandes amigos, José Dell'Aqua (Zé Mir), Leandro Rodello (Lemão), Edson Ramos de Siqueira Filho (Berbec), Karina Alberti, Gustavo Araújo (Beizola), Carla Moya, Renata Elisa Green, Bruno (Bongô), Ieda (Friera), Gabriel, Cristiane (Magrela), Cris (Purguenta), Cely e demais pelo apoio, incentivo e companhia.
- As alunas de graduação Brenda e Juliana e a pós-graduanda Cássia pelas orientações e correções do Abstract.
- Aos funcionários Walter, Márcio, Marquinho, Tico e Cristina pela ajuda que prestaram nesses anos.
- Aos profissionais Mauro Meneghetti, Tiago Losi, Edmundo Rocha Vilela, Manuel de Sá Filho e Luciano Penteado pela ajuda indispensável na execução dos trabalhos de campo.
- As fazendas Barreiro Rico (Anhembi/SP), Braido (Cerqueira César/SP), Niangara (Óleo/SP), Bela Vista (Rio Verde de Mato Grosso/MS) e Espigão (Mineiros/GO) em nome de todos os seus funcionários, pela iniciativa louvável de apoio a pesquisa fornecendo os animais para a prática experimental.
- Aos colegas do curso de pós-graduação pela convivência e troca de experiências.
- A todos que de alguma maneira contribuíram para esse trabalho...

DEDICO, HOMENAGEIO e AGRADEÇO.

RESUMO

A despeito das inúmeras variáveis que influenciam direta e indiretamente a fertilidade das fêmeas bovinas, a qualidade das amostras seminais exerce um papel importante na determinação das taxas de concepção dos programas de inseminação artificial. Os objetivos dessa pesquisa foram comparar a efetividade de dois diluidores de criopreservação de sêmen bovino no processamento de amostras seminais apresentando diferentes concentrações espermáticas em relação aos índices de congelabilidade determinados laboratorialmente (Experimento I) e as taxas de concepção proporcionadas por cada metodologia quando utilizada em programas de inseminação artificial em tempo-fixo (IATF) em bovinos (Experimento II). No Experimento I foram utilizados 14 ejaculados de diferentes touros da raça Nelore. Cada ejaculado foi fracionado em oito alíquotas iguais, submetidas a criopreservação com os diluidores Tris-gema de ovo-frutose (meio TRIS) e MKA nas concentrações de 12, 25, 50 e 100 milhões de espermatozóides totais por mililitro de meio, formando oito grupos experimentais em função das variáveis diluidor e concentração. As amostras foram descongeladas a 46 °C por 20 segundos, avaliando-se os padrões de motilidade através do método computadorizado (CASA), integridade de membrana plasmática (IMP), resistência ao teste de termorresistência rápido (TTR) e taxa de recuperação e IMP após seleção espermática pela técnica de “swim-up”. Para o Experimento II foram selecionados sete touros utilizados no Experimento I, obtendo-se um ejaculado de cada animal por eletroejaculação. As sete amostras seminais originadas foram misturadas integralmente no ato da colheita (“pool de sêmen”) e criopreservadas formando oito grupos experimentais: TRIS, 12, 25, 50 e 100, e MKA 12, 25, 50 e 100, de acordo com o meio de congelação e concentração espermática. Após prévia avaliação laboratorial as amostras foram utilizadas para a inseminação artificial em tempo-fixo (IATF) de 475 vacas no início da estação de monta de 2006. Todas as vacas foram submetidas a 2 exames ultrasonográficos ovarianos realizados no momento da IATF e dois dias após para a constatação da ovulação. Dentre as variáveis de movimento geradas no Experimento I foram observadas diferenças significativas entre os dois diluidores para a amplitude lateral de cabeça espermática (ALH), frequência de batimentos (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) independente da concentração espermática. A velocidade curvilínea (VCL) foi estatisticamente superior para os espermatozóides criopreservados em diluidor

TRIS em relação ao MKA, exceto para a concentração de 100 milhões de espermatozóides por mL. Não foi observada influência do meio diluidor ou da concentração espermática quanto a IMP pós-descongelação e pós *swim-up*, taxa de recuperação espermática e resistência ao TTR. Os índices médios de concepção obtidos para as vacas ovuladas foram de 57,63, 60,31, 59,26 e 62,50 para as amostras seminais criopreservadas em diluidor MKA e 45,61, 48,84, 60,34 e 70,59 para os ejaculados processados em diluente TRIS, respectivamente nas concentrações de 12, 25, 50 ou 100 milhões de espermatozóides por mililitro. Frente aos resultados obtidos nos Experimentos I e II, conclui-se que o diluidor MKA promoveu uma maior proteção às células espermáticas durante o processo de criopreservação resultando em um melhor padrão de movimento espermático pós-descongelação, independente da concentração espermática por palheta seminal. Embora não evidenciada a interação entre o meio de criopreservação seminal e os índices de fertilidade ($0,05 < p < 0,10$), foram observados resultados de concepção similares para amostras congeladas em meio MKA independentemente da dose inseminante. Para amostras criopreservadas em meio TRIS foi observada resposta significativa para o aumento da concentração de espermatozóides inseminados e os índices de concepção de vacas submetidas à IATF, sugerindo um efeito compensatório provavelmente relacionado a menor eficiência do processo de congelação. Resposta significativa e linear foi encontrada para o aumento da dose inseminante em relação aos índices médios de concepção das vacas inseminadas, indicando que a concentração de espermatozóides processados em palhetas de 0,5 mL exerce importante influência sobre os índices de concepção de vacas submetidas aos protocolos de IATF.

Palavras-chave: Congelabilidade espermática; Criopreservação; Diluidor; Dose inseminante; Inseminação artificial em tempo-fixado; Sêmen bovino.

ABSTRACT

Although there are many variables which directly or indirectly influence female bovine fertility, the quality of sperm samples plays a important role in the determination of conception rates in artificial insemination programs. The aim of the present study was to compare the efficiency of two bovine semen extenders for sperm freezing with different spermatic concentrations in the freezability determined by lab tests (Experiment I), and conception rates after fixed time artificial insemination (FTAI; Experiment II). In Experiment I 14 ejaculates of different Nelore bulls were used. Each ejaculate was split-sampled in to eight equal parts and then submitted to cryopreservation with Tris-egg yolk fructose (TRIS) and MKA extenders, at concentrations of 12, 25, 50 and 100 millions spermatozoa per milliliter forming eight experimental groups. The samples were thawed at 46 °C for 20 seconds, and the following parameters were evaluated: sperm motility and movement (by computer-assisted semen analysis - CASA), sperm membrane integrity (SMI), resistance to the fast thermoresistance test (TT), recovery rate and sperm membrane integrity after sperm selection through *swim-up* technique. Seven of 14 bulls used in Experiment I were selected for Experiment II, and semen was collected from each of the animals by electroejaculation. The seven ejaculates obtained were mixed (semen pool) and cryopreserved, thus forming eight experimental groups according to the freezing extenders and sperm concentrations/straws: TRIS 12, 25, 50 and 100, and MKA 12, 25, 50 and 100. At the beginning of the breeding season and after a preliminary lab evaluation, 475 cows were used in the FTAI. All the animals were submitted to two ovarian ultrasound examinations, with the first at the time of FTAI, and the second two days later, in order to confirm ovulation. In Experiment I with regard to the movement variables, significant differences between the two extenders were observed for amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), straightness (STR) and linearity (LIN), regardless of spermatic concentration. The velocity curved line (VCL) was statistically higher for semen frozen in TRIS than to MKA extender, except for concentration of 100 million spermatozoa per mL. No influence was observed either for extender or spermatic concentration in relation to SMI after thawing and *swim-up*, spermatic recovery rate and TT. The average conception rates obtained for ovulated cows were 57,63, 60,31, 59,26 and 62,50 % for seminal samples cryopreserved in MKA, and 45,61, 48,84, 60,34 and 70,59 %

for those processed in TRIS, at concentrations of 12, 25, 50 or 100 million spermatozoa per milliliter, respectively. Based on the results obtained in Experiments I and II we can conclude that MKA provided greater protection for spermatid cells during the freezing process, thus resulting in a better spermatid motility pattern after thawing regardless of spermatid concentration per straw. Even though an interaction between freezing extenders and fertility rates was not evident ($0,05 < p < 0,10$), similar conception rates were observed for samples frozen in MKA regardless of the insemination dose. For samples cryopreserved in TRIS, a significant response to the increase in inseminated spermatozoa concentration and conception rates of FTAI cows was observed, which suggests a compensatory effect, probably related to the lower efficiency of the freezing process. A significant and linear response for the increase of insemination dose, in relation to average conception rates of the animals inseminated was also found. This indicates that the concentration of spermatozoa processed in 0,5 mL straws significantly influences the conception rates in cows submitted to FTAI protocols.

Key Words: Sperm freezability; Cryopreservation; Extender; Insemination dose; Fixed-timed artificial insemination; Bull semen.

SUMÁRIO

1.0 – INTRODUÇÃO.....	01
2.0 – OBJETIVOS	04
3.0 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
3.1 – Congelação de Sêmen Bovino.....	05
3.1.1 – <i>Criopreservação Espermática</i>	05
3.1.2 – <i>Meios Diluidores</i>	08
3.1.3 – <i>Relação entre os Meios Diluidores, Congelabilidade Espermática e Fertilidade</i> ...13	
3.2 – Avaliação Laboratorial do Sêmen Bovino Congelado.....	15
3.2.1 – <i>Análise da Motilidade Espermática</i>	17
3.2.2 – <i>Avaliação Computadorizada do Movimento Espermático (CASA)</i>	18
3.2.3 – <i>Integridade de Membrana Plasmática (IMP)</i>	19
3.2.4 – <i>Testes de Separação Espermática</i>	21
3.3 – Inseminação Artificial (IA) Utilizando Sêmen Bovino Criopreservado.....	23
3.4 – Inseminação Artificial em Tempo-Fixo (IATF).....	28
4.0 – MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 – <u>Experimento I</u>	32
4.1.1 – <i>Local da Pesquisa e Animais utilizados</i>	32
4.1.2 – <i>Colheita Seminal</i>	33
4.1.3 – <i>Análise Espermática (sêmen fresco)</i>	33
4.1.4 – <i>Pré-diluição Seminal</i>	34
4.1.5 – <i>Congelação do Sêmen</i>	35
4.1.6 – <i>Descongelação Espermática</i>	36
4.1.7 – <i>Avaliação Laboratorial do Sêmen Bovino Congelado</i>	37

4.1.7.1 – <i>Análise Computadorizada do Movimento Espermático (CASA)</i>	37
4.1.7.2 – <i>Teste de Termorresistência Rápido (TTR)</i>	37
4.1.7.3 – <i>Determinação da Integridade de Membrana Plasmática (IMP)</i>	38
4.1.7.4 – <i>Swim-up</i>	38
4.1.8 – <i>Análise Estatística</i>	40
4.2 – <u>Experimento II</u>	41
4.2.1 – <i>Local da Pesquisa e Animais</i>	41
4.2.2 – <i>Congelação e Descongelação das Amostras Seminais</i>	41
4.2.3 – <i>Avaliação Laboratorial do Sêmen Bovino Congelado</i>	42
4.2.4 – <i>Local e Vacas Utilizadas para a IATF</i>	42
4.2.5 – <i>Protocolo para a IATF</i>	43
4.2.6 – <i>Exames Ultrassonográficos</i>	43
4.2.7 – <i>Análise Estatística</i>	44
5.0 – RESULTADOS.....	45
5.1 – <u>Experimento I</u>	45
5.2 – <u>Experimento II</u>	55
5.2.1 – <i>Avaliação Laboratorial do “Pool de Sêmen” Bovino Congelado</i>	55
5.2.2 – <i>Avaliação dos Índices de Fertilidade na IATF</i>	56
6.0 – DISCUSSÃO.....	67
6.1 – <u>Experimento I</u>	67
6.2 – <u>Experimento II</u>	82
7.0 – CONCLUSÕES.....	92
8.0 – REFERÊNCIAS.....	93
9.0 – APÊNDICE.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS

ALH: amplitude do deslocamento lateral de cabeça;

BCF: frequência de batimentos flagelares;

BSPs: proteínas de baixo peso molecular;

CASA: análise computadorizada do movimento espermático;

CFDA: diacetato de carboxifluoresceína;

CPs: crioprotetor penetrante;

FIV: fertilização *in vitro*;

IA: inseminação artificial;

IATF: inseminação artificial em tempo-fixado;

IMP: integridade de membrana plasmática;

IMPd: integridade de membrana plasmática pós-descongelamento;

IMPs: integridade de membrana plasmática após teste de separação por *swim-up*;

LIN: linearidade;

LDLs: lipoproteínas de baixa densidade;

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento;

mL: mililitro;

MoT: motilidade total;

MP: motilidade progressiva;

NRR: taxa de não retorno ao cio;

N₂: nitrogênio líquido;

PI: iodeto de propídeo;

Rap: velocidade rápida;

STR: retilinearidade;

TTR: teste de termorresistência rápido;

VAP: velocidade média de trajeto;

VCL: velocidade curvilinear ou real;

VSL: velocidade progressiva;

μL: microlitros;

UI: unidade internacional;

US: exames ultrassonográficos;

LISTA DE TABELAS

Páginas

TABELA–1: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozóides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozóides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozóides recuperados totais (sptzs/ μL) para as amostras criopreservadas em diluidor MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 12 milhões (12) de células totais por mililitro de meio.....**47**

TABELA–2: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozóides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozóides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozóides recuperados totais (sptzs/ μL) para as amostras criopreservadas em diluidor MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 25 milhões (25) de células totais por mililitro de meio.....**48**

TABELA–3: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozóides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozóides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozóides recuperados totais (sptzs/ μL) para as amostras criopreservadas em diluidor MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 50 milhões (50) de células totais por mililitro de meio.....**49**

TABELA-4: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozóides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozóides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozóides recuperados totais (sptzs/ μL) para as amostras criopreservadas em diluidor MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 100 milhões (100) de células totais por mililitro de meio.....**50**

TABELA-5: Médias e desvios padrão apresentados para a motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozóides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozóides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozóides recuperados totais (sptzs/ μL) para as amostras processadas em diluidor MKA nas concentrações de 12, 25, 50 ou 100 milhões (MKA 12, MKA 25, MKA 50 e MKA 100, respectivamente) de células totais por mL.....**51**

TABELA-6: Médias e desvios padrão apresentados para a motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozóides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozóides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozóides recuperados totais (sptzs/ μL) para as amostras processadas em diluidor TRIS nas concentrações de 12, 25, 50 ou 100 milhões (TRIS 12, TRIS 25, TRIS 50 e TRIS 100, respectivamente) de células totais por mL.....**52**

TABELA-7: Valores agrupados (médias e desvios padrão) de acordo com o meio diluidor de congelamento (MKA ou Tris-gema), independentemente da concentração espermática por palheta de 0,5 mililitro.....**53**

TABELA-8: Comparação entre a integridade de membrana plasmática pós-descongelamento (IMPd, %) e pós-prova de separação por *swim-up* (IMPs, %) em função da concentração espermática por palheta de 0,5 mL.....**54**

TABELA-9: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para o “pool de sêmen” criopreservado em diluidor MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 12 milhões (12) de células totais por mililitro de meio.....**58**

TABELA-10: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para o “pool de sêmen” criopreservado em diluidor MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 25 milhões (25) de células totais por mililitro de meio.....**59**

TABELA-11: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para o “pool de sêmen” criopreservado em diluente MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 50 milhões (50) de células totais por mililitro de meio.....**60**

TABELA-12: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozóides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozóides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozóides recuperados totais (sptzs/ μL) para o “pool de sêmen” criopreservado, respectivamente, em diluente MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 100 milhões (100) de células totais por mililitro de meio.....**61**

TABELA-13: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozóides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozóides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozóides recuperados totais (sptzs/ μL) para o “pool de sêmen” bovino criopreservado em diluente MKA nas concentrações de 12, 25, 50 ou 100 milhões (MKA 12, MKA 25, MKA 50 e MKA 100, respectivamente) de células totais por mililitro de meio.....**62**

TABELA-14: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozóides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozóides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozóides recuperados totais (sptzs/ μL) para o “pool de sêmen” bovino criopreservado em diluente TRIS nas concentrações de 12, 25, 50 ou 100 milhões (TRIS 12, TRIS 25, TRIS 50 e TRIS 100, respectivamente) de células totais por mililitro de meio.....**63**

TABELA-15: Efeito das variáveis meio diluidor de criopreservação e concentração de espermatozóides inseminados sobre os índices médios de concepção de vacas “ovuladas” e inseminadas em tempo-fixo.....**64**

TABELA–16: Efeito das variáveis meio diluidor de criopreservação e da interação dose inseminante/meio diluidor em relação aos índices médios de concepção de vacas “ovuladas” e inseminadas em tempo-fixo.....**63**

TABELA–17: Índices médios de concepção agrupados para vacas inseminadas em tempo-fixo em função da dose inseminante (12 a 100 milhões de espermatozoides por mililitro de meio), independentemente do diluidor de criopreservação utilizado.....**65**

TABELA–18: Índices médios de concepção observados para vacas Nelore inseminadas em tempo-fixo de acordo com a meio diluidor utilizado na criopreservação espermática e da dose inseminante (12 a 100 milhões de espermatozoides por mililitro de meio).....**65**

LISTA DE FIGURAS

Páginas

- FIGURA-1:** Esquematização gráfica dos processos de pré-diluição (item 4.1.4) e congelamento espermática (tópico 4.1.5) de acordo com o meio diluidor e concentração espermática praticada.....**36**
- FIGURA-2:** Esquematização simplificada dos procedimentos utilizados para a realização da técnica de *swim-up*.....**39**
- FIGURA-3:** Sincronização do ciclo estral e ovulação para IATF. “D0”: inserção do implante auricular Crestar® (Akzo Nobel Ltda – Divisão Intervet®, Brasil) contendo 3,0 mg de Norgestomet (17a acetoxi-11 b-metil-19 norpregna-4-em-3,20 diona) e administração de 5,0 mg de Valerato de Estradiol e 3,0 mg de Norgestomet (Intervet®, Brasil). “D9”: retirada do implante e administração de 1,5 mL de Folligon® (eCG 200UI/mL, Intervet®, Brasil). “D11”: inseminação artificial em tempo-fixa (IATF). “US 1 e 2” = exames ultrassonográficos ovarianos.....**43**
- FIGURA-4:** Integridade de membrana plasmática (%) pós-descongelamento (IMPd) e pós *swim-up* (IMPs) para amostras agrupadas dos 14 touros utilizados no Experimento I, independente da concentração espermática ou meio diluidor de criopreservação utilizado.....**54**
- FIGURA-5:** Relação entre o aumento da dose inseminante e os índices médios de concepção obtidos para vacas inseminadas em tempo-fixa de acordo com o meio de criopreservação utilizado ($p = 0,0667$).....**66**
- FIGURA-6:** Efeito compensatório ($p < 0,05$) da dose inseminante sobre os índices médios de concepção obtidos para vacas sincronizadas e inseminadas em tempo-fixa.....**66**

1.0 - INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, diversos trabalhos têm sido realizados visando aprimorar os sistemas de produção de bovinos de corte, seja através de alternativas isoladas, ou pacotes tecnológicos. A carne bovina figura como um dos principais produtos de exportação nacional. No período de janeiro a outubro de 2006 a exportação de carne brasileira rendeu US\$ 3,1 bilhões em receita cambial, valor 22,8% maior em relação aos resultados apurados no mesmo período do ano anterior (PRATINI, 2006).

O papel de destaque da carne e dos sub-produtos industrializados na geração do produto interno bruto nacional (PIB) apontam para um novo panorama de produção pecuária. Segundo Moraes (2002) atualmente não se faz necessário apenas o aumento da produtividade do setor pecuário, mas a capacidade de se produzir com sustentabilidade e competitividade garantindo a continuidade da “exploração” animal pelas gerações futuras.

Vinculada diretamente ao sistema de produção, a inseminação artificial (IA) figura como a técnica mais importante já idealizada para melhoramento animal (NUNES, 2002), atuando na otimização e globalização de material genético de touros zootecnicamente superiores.

Entretanto as deficiências básicas de manejo nas propriedades e a falta de mão de obra especializada têm limitado a difusão da técnica na maior parte dos sistemas de produção agropecuária do país, observando-se que apenas uma pequena parcela das fêmeas bovinas em idade reprodutiva são inseminadas anualmente no Brasil.

Os principais empecilhos para a implementação dos programas de IA em países de clima tropical são as baixas taxas de detecção de estro dos rebanhos e o balanço energético negativo (expresso através do escore de condição corporal), sobretudo no período pós-parto, condições que confluem na determinação dos quadros de anestro, comumente observados em rebanhos de corte formados por animais *Bos indicus* ou seus cruzamentos. O anestro pós-parto determina o aumento do

intervalo entre partos (IEP), que por sua vez leva a uma menor eficiência reprodutiva em virtude da diminuição das taxas de serviço, e por conseqüência, um menor número de vacas são inseminadas a cada ano.

Em virtude das dificuldades encontradas para a implementação da IA na grande maioria dos sistemas de produção, diversos protocolos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e ovulação foram desenvolvidos ao longo das últimas décadas tornando possível a inseminação artificial em tempo-fixo (IATF).

A IATF representa uma importante ferramenta de gestão dos rebanhos por viabilizar a utilização da inseminação artificial sem observação de estro, diminuindo o impacto do anestro pós-parto e por conseqüência determinado o aumento das taxas de serviço das propriedades, fatores determinantes de um maior ganho econômico e genético.

Apesar dos evidentes avanços na produção de gado de corte e leite vinculados ao desenvolvimento comercial da IATF, a revisão de diversos trabalhos envolvendo a utilização de diferentes protocolos de sincronização em bovinos apontam índices médios de concepção ao redor de 40 a 50%, resultados devidamente aceitáveis mas ainda distantes da performance reprodutiva ideal, tornando onerosa a biotecnologia para alguns sistemas de produção.

Inúmeras causas podem ser apontadas para a amplitude de resultados e/ou índices insatisfatórios nos programas de IATF, destacando-se os fatores inerentes a fêmea bovina como o anestro pós-parto e baixa condição corporal ao início dos protocolos, além dos diversos fatores inerentes a qualidade das amostras seminais utilizadas nos programas, como os padrões de movimento espermático, integridade de membrana plasmática e a dose inseminante praticada.

Embora a inseminação artificial utilizando sêmen bovino criopreservado represente o tipo de manejo reprodutivo mais difundido na produção pecuária mundial (CURTIS et al., 1998; FUERST-WALTL et al., 2006; MEDEIROS et al., 2002), poucos avanços tecnológicos têm sido alcançados

nas últimas décadas em relação à melhora dos índices de congelabilidade dos ejaculados, observando-se a perda significativa do potencial de fertilização da maioria das amostras criopreservadas.

Poucos trabalhos disponíveis na literatura exploram especificamente a relação existente entre a qualidade das amostras seminais e concentração de espermatozóides inseminados em relação às taxas de concepção obtidas nos programas de IATF, justificando o desenvolvimento de novos estudos que contribuam para o esclarecimento dessas e de outras questões que se encontram intimamente vinculadas ao desenvolvimento do setor pecuário.

Essa dissertação baseia-se no estudo da influência do meio diluidor para congelação de sêmen bovino e da concentração espermática sobre os índices de congelabilidade dos ejaculados (expressos através dos resultados das análises computadorizadas do movimento das células espermáticas, determinação de integridade de membrana plasmática, resistência ao teste de termorresistência rápido e técnica de separação espermática por *swim-up*) e sobre os índices de concepção observados para vacas Nelore sincronizadas e inseminadas em tempo-fixado.

2.0 - OBJETIVOS

2.1 - Avaliar a influência do diluidor de criopreservação sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen bovino pós-descongelamento.

2.2 - Avaliar o efeito da concentração de espermatozoides processados em palhetas de 0,5 mL sobre a congelabilidade do sêmen bovino;

2.3 - Verificar a influência do diluidor de congelamento sobre os índices de concepção em programas de inseminação artificial em tempo-fixado (IATF);

2.4 - Investigar a influência da concentração de espermatozoides inseminados (dose inseminante) sobre os índices de concepção de vacas Nelore submetidas a IATF.

3.0 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Congelação de Sêmen Bovino

3.1.1 -Criopreservação Espermática

A partir da introdução do glicerol como crioprotetor penetrante por Polge em 1949 e, subseqüentemente, a descoberta e utilização do agente dimetil-sulfóxido (Me₂SO) por Lovelock e Bishop em 1959, muitas células e tecidos têm sido criopreservados (WOODS et al., 2004). Tão importante quanto a descoberta dos agentes crioprotetores foi a observação de que os espermatozóides, especialmente bovinos, representavam células passíveis de congelação e que poderiam ser estocados por longos períodos de tempo e utilizados com sucesso nos programas de inseminação artificial (HOLT, 2000^b).

A utilização do sêmen bovino congelado apresenta diversas vantagens em relação às demais formas de processamento, permitindo a distribuição da genética de diferentes touros para o comércio mundial e atuando na prevenção de doenças passíveis de transmissão através do sêmen (VERBERCKMOES et al., 2005).

O sucesso da congelação espermática depende da efetividade do processamento que atua no bloqueio completo de todos os processos metabólicos desenvolvidos pelas células espermáticas, processos esses que se iniciam prematuramente nos testículos e que continuam a ocorrer nos epidídimos e após a ejaculação (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

Embora a criopreservação tenha se tornado um procedimento de rotina na indústria bovina da inseminação artificial, admite-se que a maioria dos protocolos utilizados até o presente baseiam-se em observações empíricas (CHAVEIRO et al., 2004) resultando em um número considerável de espermatozóides que falham em sobreviver ao processamento (NAGY et al., 2004). A queda de

viabilidade espermática imposta pela congelação/descongelação é responsável pela redução significativa do potencial de fertilização das amostras congeladas com a maioria das técnicas vigentes (COOTER et al., 2005; MEDEIROS et al., 2002; NAGY et al., 2004; THUN et al., 2002; WATSON, 2000).

O processo de criopreservação é responsável pelo decréscimo de 50% a 60% na viabilidade dos espermatozóides (CHAVEIRO et al., 2006; GRAVANCE et al., 1998; THOMAS et al., 1998), observando-se diversas alterações bioquímicas e estruturais abrangendo os diversos compartimentos anatômicos da célula espermática (acrossomo, núcleo, mitocôndrias, axonema, membrana plasmática). Segundo Gonzalez (2004), cerca de 85% dos espermatozóides bovinos presentes em uma amostra seminal sofrem algum tipo de injúria durante o processo de congelação/descongelação.

Em criobiologia, ramo do conhecimento que estuda os efeitos das baixas temperaturas sobre as células e tecidos, são reconhecidas 3 fases distintas que compõe o processo de criopreservação segundo Wolfe & Bryant (2001): a refrigeração que envolve o decréscimo a partir da temperatura ambiente até valores acima de 0°C; congelação que ocorre na faixa de temperatura entre 0°C a -40°C, representando o estágio no qual são observados os principais danos celulares ou crioinjúrias; e criopreservação, que apenas torna-se possível sob temperaturas abaixo de -40°C.

A fase de refrigeração representa a primeira etapa do estresse térmico submetido às células espermáticas durante a criopreservação, envolvendo a diminuição da temperatura de 35-30°C para aproximadamente 4-5°C. As quedas bruscas de temperatura durante o resfriamento podem determinar alterações letais às células espermáticas das mais diversas espécies de mamíferos, fenômeno definido como choque frio ou “cold chock” (STORNELLI, 2005; WATSON, 2000).

O choque frio caracteriza-se pela queda irreversível da motilidade espermática, alterações termodinâmicas e estruturais da membrana plasmática (rearranjo dos fosfolipídeos de membrana que sofrem uma transição do estado líquido cristalino para a fase gel levando ao aumento da

permeabilidade celular), alterações na atividade enzimática e aumento do influxo de cálcio intracelular (HOLT, 2000; JANUSKAUSKAS et al., 1999; MEDEIROS et al., 2002; WATSON, 2000). As principais injúrias celulares relacionadas ao choque frio ocorrem entre 15° a 5°C, temperatura de maior sensibilidade especialmente para os espermatozóides bovinos (STORNELLI et al., 2005; WATSON, 2000).

Durante a congelação as células estão sujeitas ao estresse resultante da interação água-soluto que surge a partir do fenômeno de cristalização do gelo (HOLT, 2000^b). A criopreservação expõe os espermatozóides a um ambiente hiperosmótico causando a saída de água intracelular, redução no volume da célula e influxo de íons (HOLT, 2000). Nesse estágio os espermatozóides tornam-se particularmente susceptíveis às altas concentrações de solutos presentes nas pequenas porções de meio extracelular que ainda se apresentam em estado líquido, afetando as interações iônicas indispensáveis à regulação enzimática celular (WOLFE & BRYANT, 2001).

Os efeitos deletérios impostos aos espermatozóides durante a criopreservação apresentam uma relação direta com a velocidade da curva de congelação praticada, que por sua vez determina alterações na pressão osmótica do meio extracelular que envolve as células espermáticas (WATSON, 2000). As alterações físicas que ocorrem durante o processamento do sêmen são dramáticas para os espermatozóides, reconhecendo-se na velocidade da curva congelação/descongelação a ferramenta para modulação da extensão e da maneira como às alterações físicas se expressam (CHAVEIRO et al., 2006).

Segundo Mazur (1970) cada variedade celular apresenta uma velocidade ótima de congelação que garante sua sobrevivência ao processamento. Nesse sentido, a taxa ideal de resfriamento deve ser suficientemente lenta para permitir a plena desidratação celular, prevenindo dessa maneira a formação de cristais de gelo intracelulares e, ao mesmo tempo, rápida o suficiente para abreviar a exposição dos espermatozóides às condições hiperosmóticas crescentes que acompanham a

desidratação das células espermáticas, situação que pode determinar a desnaturação de macromoléculas e irreversível colapso de membranas (FARRANT & MORRIS, 1973; MEDEIROS et al., 2002; STORNELLI et al., 2005).

3.1.2 - Meios Diluidores

A primeira etapa envolvida na criopreservação espermática representa a diluição das amostras seminais em meios específicos, evitando-se os efeitos deletérios relacionados ao metabolismo espermático e exposição ambiental, garantindo a manutenção do movimento celular (FOOTE, 1982). Em virtude de sua importância, considera-se que os meios diluidores desempenharam o papel mais importante para o estabelecimento da inseminação artificial como prática de manejo reprodutivo em bovinos (HURST, 1953).

Segundo revisões de Foote & Kaproth (2002), quando o sêmen bovino congelado foi testado pela primeira vez comercialmente vários fatores foram considerados, como os meios diluidores a serem utilizados, a taxa de resfriamento e a concentração de crioprotetores. O principal propósito da criopreservação do sêmen é a manutenção da capacidade fertilizante dos espermatozóides, enquanto a diluição dos ejaculados proporciona a maximização do uso de touros geneticamente superiores (KOMMISRUUD et al., 1996).

Assim como os protocolos de criopreservação empregados, a composição dos meios diluidores apresenta grande influência sobre a sobrevivência espermática durante o processamento, observando-se uma importante interação entre os componentes do meio e as taxas de refrigeração/congelação (CHAVEIRO et al., 2006).

A interação entre as células espermáticas e o meio diluidor representa um fator crucial para a preservação da integridade espermática e habilidade de fertilização (MANJUNATH et al., 2002). Segundo Bilodeau et al., (2002) para que sejam alcançados avanços na criopreservação do sêmen

bovino existe a necessidade de um melhor entendimento sobre as propriedades dos meios diluidores utilizados.

Os componentes essenciais aos meios de criopreservação representam as substâncias iônicas e não iônicas responsáveis pela manutenção da osmolaridade e tamponamento dos diluentes; fontes de lipoproteínas ou macromoléculas de alto peso molecular necessárias para prevenção do choque frio; os crioprotetores como glicerol, etilenoglicol e DMSO; fontes energéticas representadas por açúcares como glicose e frutose; e demais aditivos tais como antibióticos, enzimas e detergentes (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

Segundo Holt (2000) as principais substâncias tamponantes responsáveis pela manutenção do pH dos meios diluidores de congelação representam o citrato de sódio, Tris (tris-hidroximetil-aminometano) e Tes (N-tris-hidroximetil-aminometano ácido sulfônico).

As principais fontes de lipídeos e lipoproteínas utilizadas para a confecção dos diluentes de criopreservação de sêmen bovino provêm da gema de ovo e do leite de vaca.

Diversos meios utilizando leite integral homogeneizado e leite desnatado fresco ou reconstituído, além da água de coco, vêm sendo utilizados para a preservação seminal, embora a gema de ovo prevaleça como o componente mais utilizado para a criopreservação espermática de bovinos (AMIRAT et al., 2005).

A gema é amplamente utilizada como agente crioprotetor não permeável nos diluidores de criopreservação, atuando na proteção espermática contra o choque frio (MOUSSA, et al., 2002). O mecanismo de proteção desempenhado pela gema de ovo não é totalmente conhecido (MEDEIROS et al., 2002), embora diversos trabalhos indiquem que pequenas frações da gema compostas por lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) são responsáveis pela resistência ao choque frio (HOLT, 2000; MOUSSA et al., 2002; VISHWANATH & SHANNON, 2000).

Na maioria dos trabalhos científicos especula-se que o mecanismo de ação das LDLs relaciona-se a associação desses componentes à membrana dos espermatozóides conferindo proteção celular. Holt (2000) sugere que a ação das LDLs, embora não totalmente elucidada, deriva provavelmente de modificações na permeabilidade celular a água e íons que se relacionam a interação das lipoproteínas com estruturas da membrana plasmática dos espermatozóides, eventos que culminam na ativação de bombas iônicas que afetam o comportamento osmótico celular e a permeabilidade a crioprotetores como o glicerol.

Em contrapartida, Manjunath et al., (2002) indicam que as LDLs interagem com proteínas de baixo peso molecular presentes no plasma seminal (família das BSPs) e que por sua vez atuam na potencialização de moléculas capacitantes como as lipoproteínas de alto peso molecular e glicosaminoglicanos. Segundo os mesmos autores as BSPs atuam diretamente na desestabilização da membrana plasmática pela remoção direta de colesterol e fosfolípídeos, atuação que é abolida ou minimizada através da interação protéica com as LDLs, indicando, portanto, o mais provável mecanismo de ação da gema de ovo na proteção espermática.

A quantidade de gema usualmente utilizada é muito variável em função dos diferentes meios diluidores, observando-se, segundo Vishwanth & Shannon (2000) concentrações médias de 15% a 30% do volume total dos meios de criopreservação.

Os crioprotetores penetrantes (CPs) são necessários para o sucesso da criopreservação da maioria das células (CHAVEIRO et al., 2004). Nesse sentido várias moléculas têm sido testadas em relação à eficácia como agentes CPs, apontando-se, no entanto, o glicerol como crioprotetor de eleição para a congelação dos espermatozóides bovinos (GUTHRIE et al., 2002; HOLT, 2000).

Segundo citações de Chaveiro et al., (2004) acredita-se que os crioprotetores penetrantes como o glicerol e DMSO protegem às células espermáticas através de suas propriedades coligativas,

mantendo a concentração de solutos intra e extracelulares em níveis toleráveis e atuando na diminuição do ponto de congelação.

Apesar de indispensáveis à congelação espermática, os crioprotetores, na dependência da concentração utilizada, são tóxicos e podem acarretar a indução de danos à membrana plasmática e diminuição da motilidade espermática (MEDEIROS et al., 2002). Nesse sentido, Guthrie et al. (2002) observaram que o crioprotetor etilenoglicol determinou maior preservação dos padrões de motilidade espermática pós-descongelação em relação ao glicerol e DMSO, demonstrando os efeitos deletérios dos CPs em relação à viabilidade espermática.

Por sua vez, Gonzalez (2004) testando diversos crioprotetores para a congelação de sêmen bovino observou que o glicerol garantiu uma melhor preservação ($p < 0,05$) para a motilidade espermática, vigor, integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial quando comparado ao etilenoglicol e dimetilformamida.

Em virtude dos efeitos tóxicos relacionados à adição dos diversos CPs aos meios de congelação, diversos estudos exploraram o efeito da concentração e período de glicerolização em relação a viabilidade espermática pós-descongelação. Usualmente são utilizadas concentrações de glicerol entre 0,25 M (2,25%) a 1 M (9%) observando-se toxicidade espermática acima desses valores (FAHY, 1986). A concentração ideal de glicerol para a congelação de sêmen bovino é influenciada pelos demais componentes presentes nos meios diluidores (WISHWANATH & SHANNON, 2000), sendo que a quantidade ideal de glicerol é espécie-específica para a congelação dos espermatozóides das diferentes espécies animais, não podendo ser extrapolada, inclusive, entre os diferentes meios diluidores (CHEN et al., 1993).

Os açúcares simples representam a principal fonte de energia presente nos diluentes, oferecendo suporte à manutenção celular e movimento espermático (GRIFFIN, 2004).

Além de matriz energética os açúcares desempenham um papel importante na manutenção da pressão osmótica e aumento da viscosidade dos diluidores (HOLT, 2000; VISHWANATH & SHANNON, 2000), além de atuarem na estabilização das membranas espermáticas através da formação de pontes de hidrogênio com grupamentos polares de fosfolípídeos de membrana (LIU et al., 1998), atuando, portanto, como crioprotetores não permeáveis no caso dos dissacarídeos como trealose e sucrose ou trissacarídeos como a rafinose.

Naturalmente os espermatozóides de diversas espécies apresentam contato com açúcares como frutose e glicose presentes em pequenas quantidades no plasma seminal e produzidos e liberados pelas glândulas anexas durante a ejaculação, segundo Mann, (1946). De acordo com o mesmo autor, os espermatozóides bovinos apresentam uma maior atividade enzimática para redução da frutose (açúcar mais abundante no plasma seminal da espécie) em relação a outros açúcares como glicose e manose, representando, portanto, a fonte mais rápida de material glicosilável para geração de energia celular.

O controle do crescimento microbiano representa uma etapa importante na prevenção das enfermidades reprodutivas transmitidas através do sêmen (GRIFFIN, 2004), justificando a utilização de antibióticos nos meios de criopreservação. Diversos antimicrobianos como agentes β lactâmicos (penicilinas), aminoglicosídeos (gentamicina, estreptomicina e sulfato de amikacina) e macrolídeos (tilosina) vêm sendo utilizados isoladamente ou em associações garantindo o controle do crescimento de patógenos que naturalmente se favorecem dos próprios constituintes presentes nos diluentes, como a gema de ovo ou leite.

Hurst (1953) utilizando a associação de antimicrobianos penicilina G cristalina e sulfato de estreptomicina nos meios diluidores não observou o aumento significativo nas taxas de concepção, embora tenha concluído que a adição de antibióticos melhorou os índices de concepção médios obtidos por touros que antecipadamente foram declarados como de baixa fertilidade.

3.1.3 – *Relação entre os Meios Diluidores, Congelabilidade Espermática e Fertilidade*

A influência dos diversos diluentes de congelação de sêmen bovino sobre os índices de fertilidade animal vêm motivando uma série de trabalhos científicos desenvolvidos a partir da década de 50. Segundo Amirat et al., (2005) o sucesso da IA com sêmen bovino congelado implica na redução dos efeitos deletérios impostos às células espermáticas que podem ocorrer prematuramente a partir da diluição das amostras seminais.

Dentre os diversos componentes, a gema de ovo em combinação com o tampão Tris (tris-hidroximetilaminometano) e citrato de sódio representam os constituintes mais comumente empregados nos diluidores de congelação de sêmen bovino (VISHWANATH & SHANNON, 2000), sendo o Tris-gema de ovo o meio de criopreservação mais utilizado em todo o mundo, segundo revisões de Tardiff et al., (1997).

Chen et al., (1993) indicam que os espermatozóides bovinos congelados em meio Tris-gema de ovo glicose apresentam motilidade pós-descongelação similar ou superior às células processadas em diluidores contendo leite em pó desnatado.

Senger et al., (1983) apontam uma maior viabilidade pós-descongelação para espermatozóides bovinos processados em diluidor Tris-gema de ovo em relação às amostras criopreservadas nos diluidores a base de leite em pó desnatado ou citrato-gema.

Griffin (2004) cita uma maior preservação acrossomal para espermatozóides bovinos congelados em meio Tris-gema de ovo quando comparado aos diluidores citrato-gema (CG) e leite em pó desnatado observando-se, no entanto, uma maior proporção de células morfológicamente normais pós-descongelação proporcionado pelo CG em relação ao Tris-gema.

No entanto, apesar dos encorajadores resultados comerciais e científicos, comumente são observadas quedas ao redor de 50% nos índices de motilidade espermática pós-descongelação para o sêmen bovino criopreservado com o diluidor Tris-gema em relação ao sêmen fresco não diluído

(BILODEAU et al., 2002), resultados que justificam a busca por inovações biotecnológicas relacionadas ao processamento do sêmen de touros.

Thun et al. (2002) utilizando 78 touros de diferentes raças observaram que 25% das amostras congeladas com o diluidor Tris-gema de ovo citrato de sódio não atingiram o índice mínimo estipulado de 50% de motilidade progressiva pós-descongelação. No mesmo experimento utilizando o processamento “*one step*” (glicerolização à temperatura ambiente) foi observado que 32% das amostras congeladas em diluidor Tris-gema apresentaram motilidade progressiva pós-descongelação inferior a 50%.

Crespilho et al., (2006^b) e Crespilho et al., (2006^c) observaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para motilidade progressiva, amplitude lateral de cabeça, frequência de batimentos, retilinearidade e linearidade de movimento para espermatozóides bovinos criopreservados em meio diluidor Botu-Bov® em relação às células processadas em meio Tris-gema de ovo frutose, denotando a melhora nos índices de congelabilidade espermática proporcionada pelo diluente comercial.

Coelho et al., (2000) avaliando a influência do meio diluidor de sêmen no desenvolvimento de ovócitos bovinos em sistema de fertilização *in vitro* (FIV) observaram a queda significativa nas taxas de clivagens ($p < 0,05$) obtidas por espermatozóides criopreservados em diluidor Tris-gema em relação às células espermáticas processadas em lactose-gema ou citrato-gema de ovo.

Schenk et al., (1987) não observaram diferenças nas taxas de não retorno ao cio aos 75 dias para vacas inseminadas com espermatozóides criopreservados nos diluidores citrato-gema, TES-Tris-gema e leite homogeneizado. No mesmo estudo não foram observadas interações entre os meios diluidores utilizados e as diferentes doses inseminantes praticadas que variaram entre 11 a 22 milhões de células totais por *pellet* seminal.

Januskauskas et al., (2000) realizando 5952 IAs utilizando 25 partidas de diferentes touros observaram índices de concepção variando entre 55% a 83%, amplitude de resultados atribuída a sub-fertilidade de alguns animais utilizados no experimento, sem relação direta ao meio diluidor Triladyl® utilizado no processamento das amostras seminais.

Gérard & Humblot (1991) realizando 18068 inseminações não observaram diferença significativa entre a fertilidade média obtida por amostras seminais criopreservadas em diluidor Laiciphos® ou Tris-gema quando a dose inseminante utilizada foi de 16 milhões de células por palheta (69,2 vs 69%, respectivamente).

Já nos trabalhos conduzidos por Kommisrud et al., (1996) avaliando-se o efeito do diluidor de congelamento sobre os índices de fertilidade à IA, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,01$) entre as taxas de concepção proporcionadas pelo meio a base de leite em pó desnatado acrescido por 5% de gema de ovo em relação ao diluidor comercial Biladyl® que apresenta 20% de gema em sua constituição.

3.2 - Avaliação Laboratorial do Sêmen Bovino Congelado

Nas últimas décadas diversos métodos de análise seminal foram desenvolvidos, mas apenas uma pequena parcela dessas inovações foram adotadas na rotina de avaliação do sêmen bovino congelado (JANUSKAUSKAS & ZILINSKAS, 2002). Embora os testes de IA ou fertilização *in vitro* (FIV) representem as técnicas de maior sensibilidade para o acesso ao potencial de fertilização das amostras seminais, o alto custo e consumo de tempo das avaliações, aliado a complexidade e dependência da estabilidade laboratorial imposta pela FIV (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005; HALLAP et al., 2004), tornam impraticável a adoção de tais métodos na rotina da análise do sêmen bovino.

Diversos trabalhos desenvolvidos nas últimas duas décadas contemplam a adoção de técnicas computadorizadas de avaliação do movimento espermático, análise da integridade dos diferentes compartimentos dos espermatozóides, testes de incubação e separação de espermática, empregados isoladamente ou em conjunto, para o acesso ao potencial de fertilização das amostras de sêmen congelado.

Segundo Holt (2000^b), apesar da obviedade dos danos espermáticos que ocorrem durante o processo de congelação/descongelação, pequenas alterações espermáticas atribuídas ao processamento podem se expressar de maneira menos aparente, resultando na queda total do potencial de fertilização da célula espermática.

Fawcett (1970) indica que os principais entraves para o sucesso dos processos reprodutivos correspondem ao transporte dos espermatozóides até o ovócito e a maneira pela qual as células espermáticas realizam o processo de penetração no gameta feminino para realização da singamia.

Nesse sentido, em virtude da natureza multicompartimental dos espermatozóides e da multifatorialidade que envolve o processo de fertilização, apenas a avaliação espermática multiparamétrica pode apresentar correlações sólidas com os índices de fertilidade *in vivo*. A combinação de vários parâmetros de qualidade do sêmen bovino pós-descongelação acessados através de baterias de testes específicos podem explicar de maneira mais fidedigna as possíveis diferenças de fertilidade observadas entre touros em relação a qualquer avaliação espermática tomada isoladamente (HALLAP et al., 2004).

Segundo Braundmeier & Miller (2001), a observação de um único atributo espermático não permite mensurar adequadamente o potencial de fertilidade de uma amostra seminal, que depende, sobretudo, da funcionalidade de diversos componentes da célula espermática.

3.2.1 - Análise da Motilidade Espermática

Uma das principais adaptações evolutivas observadas nos animais de fecundação interna representa o desenvolvimento do aparato locomotor espermático adaptado para a progressão no trato reprodutor feminino (FAWCETT, 1970).

Os padrões de movimento desempenhados pelos espermatozóides representam uma das características mais importantes associadas ao potencial de fertilização de uma amostra seminal (SOZÁNSKA et al., 2005), expressando a capacidade das células espermáticas em transpor as diversas barreiras representadas pelo trato reprodutor feminino, chegando ao ovócito. A capacidade de movimentação dos espermatozóides representa um dos principais requisitos para a fertilização (HOLT, 2000), reportando-se uma clara associação entre a ausência de movimento espermático e os quadros de infertilidade (OLDS-CLARKE, 1996).

Usualmente a motilidade espermática é estimada de forma subjetiva através da avaliação visual das células sob microscopia óptica convencional (ARRUDA et al., 2004; CRESPILO et al., 2006; JANUSKAUSKAS & ZILINKAS, 2002; PESH & BERGMANN, 2006), representando a principal análise laboratorial utilizada pelas centrais de IA para o acesso a viabilidade espermática (GRAHAM, 2001; JANUSKAUSKAS et al., 2001; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2000).

Uma das principais características apresentadas pelos espermatozóides criopreservados representa a queda da motilidade celular (WATSON, 2000), denotando a importância da observação dos padrões de movimento espermático como marcadores da eficiência do processo de congelamento.

Apesar da importância da análise no contexto da avaliação seminal, a relação entre motilidade espermática e fertilidade permanece contraditória. Segundo citações de Martínez-Rodriguez (2000) e Martínez-Rodriguez (2005) a correlação entre motilidade e fertilidade sofre grande divergência entre os diferentes trabalhos de pesquisa, variando de 0,15 a 0,83.

A subjetividade da análise, que depende sobretudo da experiência do técnico que conduz o exame, leva a uma baixa acurácia em termos de repetibilidade do teste, determinando uma baixa correlação entre motilidade e fertilidade animal (BRAUNDEMEIR & MILLER, 2001; JANUSKAUSKAS et al., 2000). De acordo com as citações de Sozánska et al., (2005) e Verstegen et al., (2002), são reportadas variações de 30 a 60% na estimativa da motilidade espermática para o mesmo ejaculado quando avaliado subjetivamente por diferentes técnicos.

3.2.2 - Avaliação Computadorizada do Movimento Espermático (CASA)

Com o propósito da obtenção de uma técnica que demonstrasse maior repetibilidade para determinação da motilidade espermática, diversos sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados (ARRUDA et al., 2004). A análise computadorizada do movimento espermático (CASA) foi introduzida a partir da década de 80 com o objetivo de se analisar características adicionais relativas aos padrões de movimento espermático imperceptíveis à avaliação visual (SIDHU et al., 1998). Segundo Ferreira (2000) a análise computadorizada representa indiscutivelmente o maior avanço no campo da avaliação do movimento espermático.

O sistema CASA representa um método objetivo que gera informações importantes a respeito das propriedades cinéticas de um ejaculado baseando-se na avaliação individual das células (JANUSKAUSKAS & ZILINSKAS, 2002), o que permite a identificação de diferentes subpopulações espermáticas em uma amostra (VERSTEGEN et al., 2002).

O detalhamento da cinética celular proporcionada por CASA reflete indiretamente a atividade metabólica espermática (GIL et al., 2000) e diretamente a qualidade dos espermatozóides presentes em uma amostra seminal (FARREL et al., 1998).

Os principais parâmetros de movimento gerados por CASA correspondem, segundo Arruda et al., (2004), Farrell et al., (1998) e Ferreira (2000): motilidade total (MT, %) representada pela soma de todas as células móveis; motilidade progressiva (MP, %), determinada pela porcentagem de células que se movem progressivamente; velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), corresponde a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto; velocidade curvilínea ou real (VCL, $\mu\text{m/s}$), que é a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula; amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), é a largura média da oscilação da cabeça espermática ao longo do movimento; frequência de batimentos flagelares (BCF, Hz); retilinearidade (STR, %), é o valor médio da proporção entre $VSL/VAP \times 100$; linearidade (LIN, %) é o valor médio da proporção entre $VSL/VCL \times 100$; e velocidade rápida (VR, %).

Apesar da grande controvérsia existente a respeito da correlação do movimento espermático com os índices de fertilidade *in vivo*, são observadas diferenças significativas nos padrões de movimento entre espermatozoides que alcançam altas e baixas taxas de fertilização (VERSTEGEN et al., 2002).

Segundo Farrel et al., (1998) a associação de múltiplas variáveis de movimento geradas pela técnica CASA demonstra uma maior correlação com fertilidade *in vivo* em relação à utilização de apenas um atributo de movimento.

3.2.3 - Integridade de Membrana Plasmática (IMP)

As diversas membranas que compõe a célula espermática (nuclear, plasmática, acrossomal e mitocondrial) representam agregados de lipídeos e proteínas assimilados durante a espermatogênese e modificados durante o trânsito e estocagem nos epidídimos e no momento da ejaculação (HAMMERSTEDT et al., 1990). A membrana plasmática ou plasmalema corresponde ao maior

domínio de membrana dos espermatozóides, envolvendo a célula espermática em toda sua extensão (PESH & BERGMANN, 2006).

A porcentagem de espermatozóides viáveis em uma amostra seminal pode ser definida pela quantidade de células que exibem estabilidade e integridade de membrana plasmática (GRAHAM & MOCE, 2005, GRAHAM, 2001; JANUSKAUSKAS et al., 1999; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005). De acordo com Holt (2000), para que ocorra a fertilização às células espermáticas devem apresentar uma superfície de membrana quimicamente apropriada para evitar a fagocitose ou a ligação irreversível às células epiteliais do trato reprodutor feminino.

Segundo PAPA et al., (2000), a presença de IMP é um pré-requisito para que ocorram os eventos fisiológicos relacionados ao processo de fertilização, que incluem a capacitação espermática, ligação à zona pelúcida, reação acrossomal e fusão dos gametas.

Em virtude das características intrínsecas aos espermatozóides, desprovidos de atividade biossintética, reparadora, de crescimento e divisão (YOSHIDA, 2000), observa-se uma grande vulnerabilidade celular ao processo de congelação/decongelação, resultando, particularmente, na ruptura e desestabilização das membranas durante a criopreservação (MARTÍNES et al., 2006).

Nesse sentido, vários testes têm sido empregados para a determinação da IMP, como as colorações supra-vitais incluindo Tripán-Blue-Giensa e Eosina-Nigrosina, testes osmóticos hiposmóticos e mais recentemente o uso das sondas fluorescentes, moléculas que atuam através de reações com enzimas citoplasmáticas ou da ligação com o DNA espermático (ARRUDA et al., 2004; BRITO et al., 2003; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005).

As preparações empregando a combinação de sondas fluorescentes ou fluorocromos, avaliadas através de microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo, destacam-se como as mais estudadas e utilizadas na determinação da IMP dos espermatozóides, gerando dados quantitativos

sobre a permeabilidade relativa das membranas, conferindo especificidade na discriminação entre células funcionais e afuncionais (GARNER et al., 1986; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2003).

As principais sondas utilizadas para determinação da viabilidade espermática representam o iodeto de propídeo (PI), SYBR-14, Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA), Hoeschst 33258 (H258) e 33342 (H342), e a Concanavalina A (Conc A) associada ao isotiocionato de fluoresceína (ARRUDA et al., 2004; HARRISON & VICKERS, 1990).

Embora existam relatos indicando grande variabilidade entre a correlação dos índices de fertilidade com a integridade de membrana plasmática de amostras de sêmen bovino congelado (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2003), diversos trabalhos sinalizam para efetividade da técnica como ferramenta de análise das amostras seminais.

Tartaglione & Ritta, (2004) associando os valores obtidos para a IMP determinada por colorações supra-vitais e teste hiposmótico conseguiram explicar 82,4% das variações encontradas nas taxas de fertilização *in vitro*. O número de espermatozóides viáveis presentes em amostras de sêmen bovino congelado correlaciona-se positivamente com fertilidade, sendo reportado que a proporção de IMP avaliada através de sondas fluorescentes representa um dos parâmetros seminais de maior impacto isolado na predição do potencial de fertilização das amostras espermáticas (JANUSKAUSKAS et al., 2003).

3.2.4 - Testes de Separação Espermática

Os procedimentos de separação espermática permitem a recuperação de espermatozóides de melhor qualidade, exibindo maior proporção de movimento progressivo e de células morfolologicamente normais, o que justifica a ampla utilização das diversas técnicas nos trabalhos de fertilização *in vitro* (SAMARDZIJA et al., 2006).

Os diferentes procedimentos de separação utilizados permitem a remoção dos diluentes de criopreservação, agentes infecciosos, debris e fatores decapacitantes incorporados pelas células espermáticas durante o transporte e estocagem nos epidídimos (SOMFAI et al., 2002).

Dentre os principais métodos de separação utilizados destacam-se o *swim-up*, separação por gradiente descontínuo de BSA, filtração em coluna de lã de vidro, técnica do sedimento ou *swim-down*, filtração em coluna de sefadex/filtro de troca iônica, separação por gradiente descontínuo de Percoll e lavagem mediante centrifugação (COELHO et al., 2000).

Apesar da gama de possibilidades, as técnicas que empregam unicamente lavagens e centrifugações como mecanismo básico de separação espermática podem resultar, direta ou indiretamente, em danos irreversíveis aos espermatozóides (CENTOLA et al., 1998), havendo, portanto, a preferência por métodos baseados na própria capacidade de migração espermática para efeito de avaliação da qualidade das amostras seminais.

Nesse contexto, o *swim-up* pode ser definido como um teste multifuncional que avalia a capacidade espermática em transpor diferentes barreiras fluidas, semelhante ao processo que ocorre durante o transporte espermático no trato reprodutor feminino, representando uma alternativa valiosa para o acesso a viabilidade do sêmen bovino congelado.

O *swim-up* mimetiza laboratorialmente o processo de seleção espermática que ocorre naturalmente na junção útero-tubárica do aparelho reprodutor feminino, evidenciando o número de espermatozóides presentes em uma amostra que se encontram aptos ao processo de fertilização (MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, 2005).

Somfai et al., (2002) observaram uma maior proporção de células viáveis (expressa pela integridade das membranas plasmática e acrossomal) após a recuperação por *swim-up* em relação ao mesmo parâmetro avaliado imediatamente pós-descongelação, confirmando a utilidade da técnica como ferramenta de seleção de espermatozóides bovinos. Resultados similares foram apresentados

por Correa & Zavos (1996) que observaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na motilidade total e integridade de membrana plasmática para espermatozóides bovinos selecionados em meio Ham's F-10 contendo cafeína em relação às amostras seminais não submetidas a procedimentos de seleção pós-descongelamento.

Segundo Parrish & Foote (1987), o número de espermatozóides recuperados ao *swim-up* apresenta uma alta correlação com a quantidade de células viáveis presentes em uma amostra seminal. Nesse sentido, Zhang et al., (1999) encontraram correlação significativa entre os espermatozóides separados por *swim-up* (concentração e concentração de espermatozóides móveis) com os resultados ao teste de ligação a zona pelúcida e com a taxa de formação de blastocistos na fertilização *in vitro*. Martínez-Rodríguez (2003) indica uma correlação positiva ($r = 0,43 - 0,63$) entre número de espermatozóides normais recuperados pós *swim-up* e os índices de fertilidade *in vivo*.

Segundo PHILLIPS et al., (2004) todos os parâmetros gerados a partir da técnica de *swim-up* correlacionam-se positivamente com a taxa de não retorno ao estro das fêmeas bovinas, destacando-se o número de espermatozóides normais ($p \leq 0,01$), concentração espermática recuperada e motilidade total ($p \leq 0,02$) e número de células exibindo movimento progressivo pós *swim-up* ($p \leq 0,05$).

3.3 – Inseminação Artificial (IA) Utilizando Sêmen Bovino Criopreservado

Após a primeira descrição da célula espermática por Leeuwenhoek em 1678, aproximadamente 100 anos se passaram até que a inseminação artificial fosse documentada (FOOTE, 1982). O mérito da primeira inseminação descrita cientificamente coube ao monge e professor de ciências naturais da Universidade de Pávia/Itália, Lázaro Spalanzani, que realizou em 1780 uma IA intravaginal em cadela resultando no nascimento de 3 filhotes viáveis. Outros 100 anos

se passaram até que o pioneirismo do russo Ivanow (1899) determinasse o início de uma série de trabalhos envolvendo a utilização prática da IA em diversas espécies de animais de produção, além de cães, raposas e roedores (FOOTE, 2002^b). Coube também ao russo os primeiros esforços para o desenvolvimento dos meios diluidores de conservação espermática e o treinamento dos primeiros técnicos encarregados da seleção de reprodutores cujas progênes seriam multiplicadas através da IA, representando, portanto, o marco inicial da inseminação artificial como ferramenta de produção animal.

Anteriormente ao desenvolvimento dos procedimentos de congelação/descongelação dos espermatozoides, a inseminação artificial em bovinos era realizada com sêmen fresco (VERBERCKMOES et al., 2005), observando-se uma longevidade espermática média ao redor de 48 horas (THACKER & ALMQUIST, 1953). A baixa longevidade aliada a queda da viabilidade espermática em virtude da estocagem a temperatura ambiente representavam os principais entraves para a difusão da técnica de IA nos sistemas de produção das mais diversas espécies animais. Tal panorama só fora mudado a partir de meados do século XX com o advento dos agentes crioprotetores, moléculas capazes de garantir a sobrevivência espermática após o processamento sob baixas temperaturas, viabilizando a estocagem de material genético por longo período de tempo.

O primeiro bezerro produzido através da IA com sêmen bovino congelado data de 1951 a partir dos trabalhos inovadores de Stewart e colaboradores, segundo revisões de Curry (2000), representando o marco inicial para o estabelecimento das técnicas utilizadas até o presente. De acordo com Parkinson (2004), a partir da introdução da inseminação artificial na década de 50, paulatinamente foi observada a substituição da monta natural como ferramenta de escolha para o manejo reprodutivo bovino na maioria dos países desenvolvidos do mundo.

Isoladamente a IA representa a mais importante técnica utilizada para o melhoramento genético animal (SUGULLE et al., 2006), representando, segundo Baruselli et al., (2004) uma

biotecnologia fundamental para a obtenção de animais com maior potencial de produção e reprodução.

As principais vantagens relacionadas a utilização da IA empregando sêmen bovino criopreservado representam o incontestável ganho genético garantido através da utilização de touros de mérito zootécnico comprovado; otimização de animais melhoradores através da diluição dos ejaculados; prevenção de doenças sexualmente transmissíveis garantida pelas rigorosas avaliações sanitárias perfilhadas para animais submetidos a regimes de coleta espermática; facilidade de transporte de amostras seminais, difundindo e permitindo o intercâmbio de genética superior para as mais diversas regiões do globo; prevenção de acidentes e incidentes decorrentes do transporte de reprodutores objetivando programas de monta natural. Em suma, o objetivo dos programas de IA é maximizar a produção de bezerros de qualidade em função do número de vacas em reprodução e em um menor intervalo de tempo (SUGULLE et al., 2006).

Apesar do marcante papel da IA como biotecnologia de melhoramento genético animal, em muitos países como o Brasil e demais nações do Mercosul é observada uma baixa porcentagem do rebanho bovino incluído nos programas (BÓ, 2003). Segundo dados da ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial) menos de 5% do rebanho efetivo nacional utiliza a IA como ferramenta de manejo reprodutivo. Tal panorama representa uma grande ameaça para o país que ao longo dos anos participa de uma disputa mercadológica acirrada frente a nações como Austrália e Nova Zelândia pela hegemonia mundial na exportação da carne bovina.

Diversos fatores podem ser apontados para a baixa taxa de utilização da inseminação artificial no manejo reprodutivo bovino, destacando-se, segundo Barros et al., (2004) a carência de mão de obra qualificada e deficiências básicas de manejo nas propriedades. Ainda, os programas de IA nos trópicos tem como principal empecilho a baixa taxa de detecção do estro, visto ser o rebanho bovino

Zebu o tipo predominante e que não demonstra claramente os sinais de cio (GALINA et al., 1996), sendo observada uma grande variabilidade entre a duração do estro (1,3 a 20 horas) e o intervalo início do estro/ovulação (19 a 29 horas) segundo BÓ et al., (2003). Saumande & Humblot (2005) destacam que o longo intervalo entre o início do estro/ovulação e alta variação neste intervalo especialmente para vacas, representam a origem de baixos índices de fertilidade.

Rotineiramente milhões a bilhões de espermatozóides são utilizados para a inseminação artificial das mais diversas espécies de animais de produção, observando-se, no entanto, que apenas uma minúscula parcela dessas células espermáticas alcançam o sítio de fertilização (GUTHRIE et al., 2002).

O número mínimo de espermatozóides necessários para a obtenção de aceitáveis índices de fertilidade corresponde ao grande desafio da indústria bovina da IA (FOOTE & KAPROTH, 1997), permitindo a otimização de touros geneticamente superiores (MARTINS Jr. et al., 2006), garantindo um maior número de vacas inseminadas (DEN DAAS et al., 1998) e maior retorno econômico.

Atualmente a produção de amostras seminais com menor número de espermatozóides toma relevância ainda maior com o advento do sêmen bovino sexado, cujo baixo rendimento industrial exige o processamento e a comercialização de palhetas contendo baixas doses inseminantes (CRESPILHO et al., 2006^c; GARNER et al., 1997).

Em virtude da queda de viabilidade espermática pós-descongelamento, tornam-se necessárias concentrações espermáticas 3 vezes maiores para que o sêmen bovino criopreservado alcance taxas de fertilização comparáveis às obtidas com o sêmen fresco (CHAVEIRO et al., 2006). A ausência de adequado número de espermatozóides ou a redução na longevidade espermática no trato reprodutor feminino representam as principais causas das falhas de fertilização em bovinos (SHANNON & VISHWANATH, 1995). Segundo Watson (2000) a redução no número ou na qualidade dos espermatozóides inseminados resulta na queda exponencial dos índices de fertilidade.

O número de espermatozóides inseminados e o sítio de deposição do sêmen no trato reprodutor feminino parecem interagir influenciando os índices de concepção animal (DALTON, 1999; KURYKIN et al., 2005; SCHENK et al., 1987).

Tendo em vista a grande importância econômica e biológica, diversos trabalhos de pesquisa têm sido desenvolvidos nas últimas décadas buscando-se determinar a provável correlação existente entre a concentração de espermatozóides inseminados e os índices de fertilidade animal.

Jondet (1972) não observou diferença significativa entre as taxas de não retorno ao cio (NRR) apresentados por vacas inseminadas com doses de 3 ou 14 milhões de espermatozóides viáveis.

Seguindo a mesma linha de pesquisa Foote & Kaproth (1997) observaram que o número de espermatozóides por palheta pode ser reduzido para 10 milhões de células totais para a maioria dos touros em regime de coleta sem que ocorram prejuízos aos índices de concepção, sinalizando para a grande influência exercida pelo touro sobre os índices de fertilidade alcançados nos programas de IA.

Os touros diferem significativamente não apenas quanto aos índices máximos de fertilidade alcançados como também a maneira como as taxas de concepção se elevam em função do aumento da dose inseminante (DEEN DAAS et al., 1997; GRAHAM, 2001; SHANNON & VISHWANATH, 1995), observando-se que para alguns animais, doses de sêmen congelado contendo 2 milhões de espermatozóides totais são suficientes para garantir índices de fertilidade normais nos programas de IA (ANDERSSON et al., 2004; KURYKIN et al., 2005).

Em contrapartida Nehring & Rothe (2003) observaram que a redução da dose inseminante de 15 para 5 milhões de células totais acarretou a queda significativa de 3 a 5% nos índices de fertilidade à IA, independente do meio diluidor utilizado para a criopreservação espermática.

Schenck et al., (1987) apontam resultados de concepção pós-IA significativamente menores para vacas inseminadas com 11 milhões de espermatozóides totais em relação a utilização de doses

inseminantes mais concentradas. Resultados similares também foram reportados por Shannon & Vishwanath (1995), apontando diferenças significativas nas taxas de NRR para vacas inseminadas com 20 ou 5 milhões de espermatozóides totais ($p < 0,001$).

Gérard & Humblot (1991) observaram diferença significativa nas NRRs aos 60-90 dias para vacas à primeira inseminação de acordo com a dose inseminante praticada. Nesse experimento não foram observadas diferenças entre as concentrações de 8 a 12 milhões de células totais inseminadas, que por sua vez, determinaram menores taxas de concepção ($p < 0,02$) em relação a dose de 16 milhões de espermatozóides, independente do meio diluidor de criopreservação utilizado.

3.4 – Inseminação Artificial em Tempo-Fixo (IATF)

Impulsionados pelo maior entendimento sobre a fisiologia reprodutiva da fêmea bovina, diversos protocolos hormonais capazes de regular o crescimento dos folículos e o momento da ovulação têm sido desenvolvidos e empregados comercialmente, viabilizando a inseminação artificial em tempo-fixado (IATF) e eliminando a observação de cio (THATCHER et al., 2001).

A IATF representa a melhor alternativa para aumentar significativamente o número de animais inseminados (BÓ et al., 2003), determinando, conseqüentemente, o aumento das taxas de serviço na espécie bovina. Segundo Madureira (2000) a real vantagem da IATF é a de que 100% das fêmeas podem ser inseminadas após os tratamentos de sincronização, enquanto que apenas 60% delas seriam IA no período de 3 semanas, em um sistema tradicional.

Dentre os inúmeros protocolos disponíveis, o uso de dispositivos liberadores de progesterona ou progestágenos associados à administração de estrógenos correspondem ao tratamento mais utilizados para a IATF em bovinos (BARROS et al., 2004; BÓ et al., 2003).

A progesterona e os agentes progestágenos correspondem ao tratamento comumente utilizado para restabelecer a ciclicidade ovariana pós-parto por permitir o aumento da frequência de pulsos de LH prevenindo a atresia do folículo dominante (BARUSELLI et al., 2004^b; DAY, 2004) e evitando a manifestação prematura do estro nos programas de sincronização (DEJARNETTE et al., 2001).

Os estrógenos quando administrados em presença de progesterona endógena ou exógena levam a diminuição dos níveis circulantes de FSH e LH provocando a atresia dos folículos dominantes (BARUSELLI et al., 2004; MADUREIRA, 2000), o que leva à sincronização da emergência de uma nova onda folicular (DUFFY et al., 2004).

Além da onda de crescimento folicular, a sincronização da ovulação representa uma ferramenta importante para o sucesso da IATF, garantindo maior precisão no momento e nos mecanismos responsáveis pela ovulação animal. Fármacos indutores de ovulação como os estrógenos ou GnRH agem através de retroalimentação positiva sob a liberação pulsátil de LH; já os hormônios hCG, ou LH atuam diretamente nos receptores de LH presentes nas células da granulosa dos folículos ovarianos desencadeando o processo ovulatório (BARUSELLI, 2004; FERNADES, 2001).

A incorporação de estradiol ou eCG ao término de um tratamento de sincronização com progestágenos pode resultar em antecipação e maior sincronização do estro (DUFFY et al., 2004). O eCG ou PMSG apresenta ações biológicas de FSH e LH, contribuindo para o crescimento, maturação e ovulação do folículo dominante presente no momento das aplicações (MOREIRA, 2002).

Segundo Kastelic et al., (1999) a administração de eCG no momento da retirada dos implantes progestágenos é usualmente recomendada, especialmente se uma alta proporção dos animais sincronizados apresentarem-se em anestro. A aplicação do eCG na retirada dos dispositivos progestágenos levam ao aumento da concentração plasmática de progesterona e das taxas de concepção em vacas *Bos indicus* em anestro pós-parto, resultando em uma maior eficiência reprodutiva (BARUSELLI et al., 2004^b).

Apesar dos evidentes avanços nos sistemas de produção de gado de corte vinculados ao desenvolvimento comercial da IATF, a revisão de diversos trabalhos envolvendo a utilização de diferentes protocolos de sincronização em bovinos apontam índices médios de concepção ao redor de 40 a 50% (BÓ, et al., 2003; BRIDGES et al., 1999; KASIMANICKAM et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2001; MENEGUETTI et al., 2006; THATCHER et al., 2001), resultados devidamente aceitáveis, mas ainda distantes da performance reprodutiva ideal, tornando onerosa a biotecnologia da IATF para alguns sistemas de produção.

Inúmeras causas podem ser apontadas para a amplitude de resultados e/ou índices insatisfatórios nos programas de IATF, como a baixa condição corporal dos animais ao início do tratamento (BARUSELLI et al., 2004; BÓ et al., 2003); momento do ciclo estral em que o protocolo é iniciado (VASCONCELOS, et al., 1999); formação de folículos persistentes anovulatórios (MARTINEZ et al., 2001); e tamanho do folículo dominante durante a indução da ovulação, característica que pode determinar uma maior amplitude no momento ovulatório (BÓ et al., 2003), interferindo negativamente nos índices de fertilidade animal. O momento da ovulação, relacionado ao comportamento de estro e ao pico de LH, muitas vezes pode sofrer variações de acordo com o protocolo de sincronização utilizado (CAVALIERI et al., 1997).

Outro fator correlacionado positivamente com o sucesso dos protocolos de IATF mas que a muito vêm sendo negligenciado corresponde à qualidade do sêmen empregado nos programas.

4.0 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos complementares de acordo com os objetivos anteriormente propostos. No Experimento I foi avaliada a influência do meio diluidor e da concentração de espermatozóides processados em palhetas de 0,5 mL sobre os índices de congelabilidade dos ejaculados bovinos.

No Experimento II foram avaliados os índices de concepção proporcionados por diferentes diluidores de congelação e diferentes doses inseminantes para vacas da raça Nelore ou ½ sangue Nelore inseminadas em tempo-fixado.

4.1 – Experimento I: Efeito do Meio Diluidor e da Concentração Espermática sobre a Viabilidade *in vitro* do Sêmen Bovino Congelado.

4.1.1 – *Local da Pesquisa e Animais utilizados*

As atividades experimentais envolvendo a avaliação laboratorial, processamento, congelação e estocagem das amostras seminais foram conduzidas no CERAN (Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal) pertencente ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, UNESP, Campus de Botucatu/SP.

Para o estudo foram obtidas amostras seminais de 14 touros (idade entre 22 a 30 meses) da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) pertencentes às Fazendas Barreiro Rico (Anhembi/SP) e Niangara (Óleo/SP), propriedades situadas na região centro sul paulista. Todos os touros utilizados foram previamente avaliados por exame andrológico, atendendo as especificações previstas pela normativa do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) que determina os padrões mínimos de qualidade para as amostras de sêmen bovino.

Especificamente quanto a análise de morfologia espermática foram adotados como parâmetros mínimos de qualidade a porcentagem de defeitos maiores inferior a 15%, menores 20% e defeitos totais inferiores a 25%. Todas as amostras que não se enquadraram às especificações foram descartadas do experimento.

4.1.2 – Colheita Seminal

Previamente a cada colheita os animais contidos em bretes individuais receberam higienização externa na região prepucial por meio de toalhas de papel.

As amostras seminais foram obtidas por eletroejaculação (Aparelho Eletrovet® Máster I, Eletrovet®, São Paulo) por meio de um sistema composto por funil plástico e tubo coletor graduado de 15 mL envolto por um protetor isotérmico, evitando-se, dessa maneira, possíveis choques bruscos de temperatura e a exposição direta à luz solar.

4.1.3 – Análise Espermática (*sêmen fresco*)

Imediatamente após a colheita os ejaculados foram avaliados subjetivamente quanto a motilidade total e vigor espermático sob lâmina e lamínula em microscopia de luz sob aumento de 400 vezes. A concentração espermática foi determinada através de câmera hematocimétrica de Neubauer, também sob microscopia óptica convencional em aumento de 100 a 400 vezes. Foram consideradas aptas para egresso no experimento apenas as amostras que apresentaram motilidade total superior a 70%, vigor ≥ 3 (escala de 0 a 5) e concentração espermática acima de 2 bilhões de células por ejaculado.

Outros parâmetros de qualidade seminal como volume, coloração (branco-acinzentado a amarelo citrino) e aspecto (aquoso, leitoso ou cremoso) foram analisados visualmente no ato da colheita.

4.1.4 – Pré-diluição Seminal

Foram utilizados dois diluidores de congelação no experimento: o meio Tris (tris-hidroximetilaminometano)-gema de ovo frutose (Grupo TRIS, APÊNDICE-1) e o diluidor MKA desenvolvido pelo Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da UNESP Campus de Botucatu/SP, representando o precursor do diluente comercial Botu-Bov® (Biotech Ltda, Botucatu/SP).

Por motivos relacionados a inadequação da rede elétrica (currais sem tomadas elétricas, quedas e oscilações de voltagens) e problemas físicos relacionados às instalações das fazendas (ausência de áreas cobertas separadas dos currais para manipulação de material biológico) optou-se pelo não processamento do sêmen no local, efetuando-se apenas uma pré-diluição dos ejaculados (processamento “*two steps*”) com a fração I de cada meio diluidor (fração isenta de crioprotetores) viabilizando o transporte do material para o laboratório CERAN da FMVZ UNESP – Botucatu/SP.

Após a avaliação prévia os ejaculados foram fracionados em sua totalidade em 8 alíquotas recebendo o seguinte processamento de acordo com o meio diluidor e concentração espermática pretendida: diluidor MKA fração I utilizado de forma a atender metade do volume necessário para o processamento final de amostras contendo 12, 25, 50 e 100×10^6 espermatozóides totais por mililitro de meio (Grupos MKA 12, MKA 25, MKA 50 e MKA 100, respectivamente), observando-se as mesmas taxas de diluição para o diluidor TRIS fração I (Grupos TRIS 12, TRIS 25, TRIS 50 e TRIS 100).

As amostras pré-diluídas dos 8 grupos experimentais foram acondicionadas em tubos graduados de 15 mL e submetidas a refrigeração passiva em caixa isotérmica modelo Botutainer® (Biotech Ltda, Botucatu/SP; APÊNDICE-2). O material foi transportado sob refrigeração em torno de 5°C por período inferior ou igual a 60 minutos para o processamento laboratorial.

4.1.5 – Congelação do Sêmen

Imediatamente após a chegada ao laboratório as amostras seminais receberam a segunda fração de meio diluidor (fração contendo agentes crioprotetores) previamente resfriado para a temperatura de 5°C (glicerolização a 5°C). As diluições foram realizadas de acordo com cada grupo experimental estabelecido anteriormente originando as 4 concentrações espermáticas pretendidas no experimento (12, 25, 50 e 100 milhões de espermatozóides totais por mililitro de meio).

As amostras diluídas foram envasadas manualmente em palhetas francesas de 0,5 mL (IMV® Technologies, França), previamente identificadas quanto ao número do touro, meio diluidor de criopreservação e concentração espermática. As palhetas foram lacradas com álcool polivinílico e dispostas em bandejas metálicas teladas para o início do processo de congelação.

As amostras lacradas foram transferidas para geladeira digital (Minitüb®, Alemanha) a temperatura constante de 5°C por 3 horas para continuidade da curva de resfriamento iniciada no sistema de transporte de refrigeração passivo, concretizando-se o período de estabilização de 4 horas.

A curva de congelação foi realizada em vapor de nitrogênio líquido (N₂) através do acondicionamento das amostras seminais em caixas de isopor convencional de 40 litros a uma distância fixa de 5 cm acima do nível do N₂ por 20 minutos. Decorrido o período inicial de congelação as palhetas foram imersas diretamente no nitrogênio líquido e raqueadas para o acondicionamento em botijões criobiológicos. Para padronização das análises foi instituído um período mínimo de 3 dias de estocagem para o início das avaliações laboratoriais.

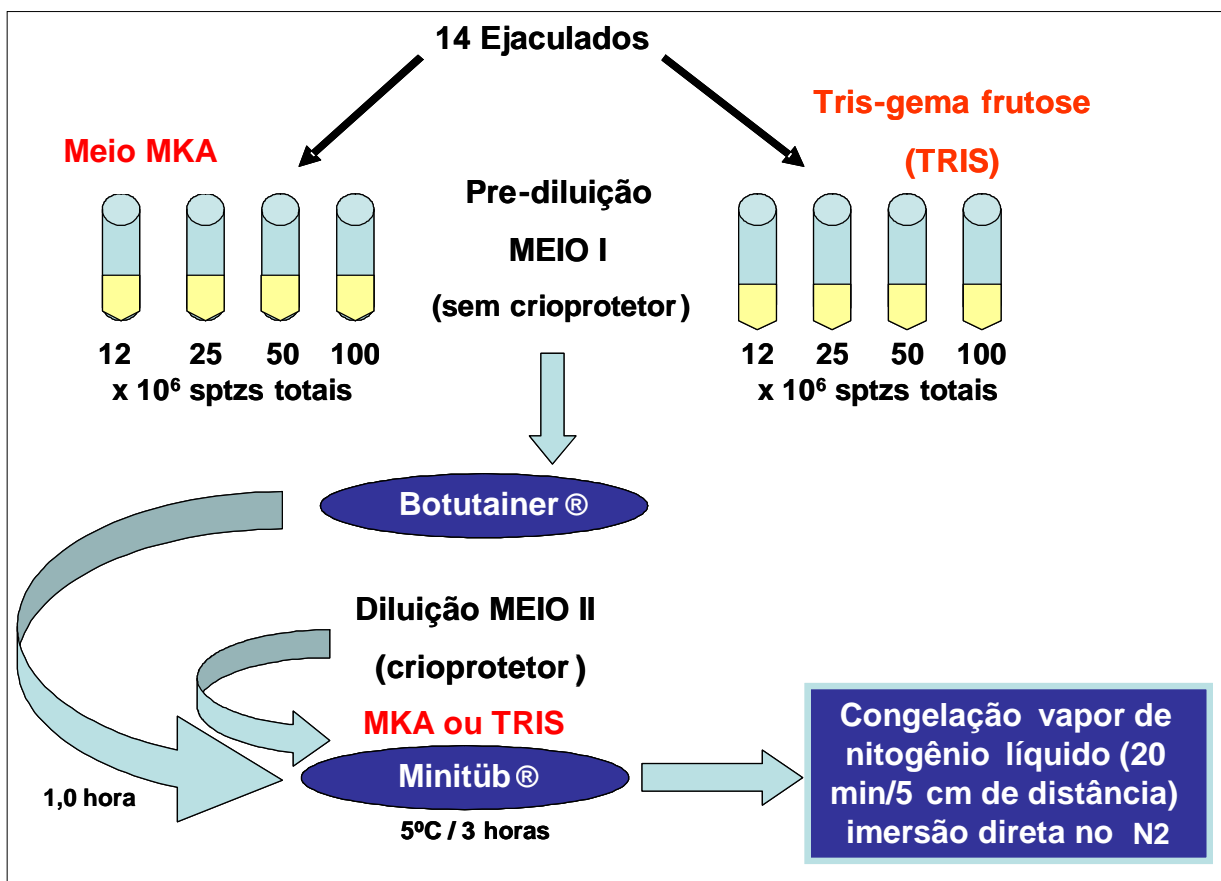


FIGURA-1: Esquemática gráfica dos processos de pré-diluição (item 4.1.4) e congelamento espermática (tópico 4.1.5) de acordo com o meio diluidor e concentração espermática praticada.

4.1.6 – Descongelamento Espermática

As amostras foram descongeladas em “banho-maria” a 46°C por 20 segundos (DELL’AQUA Jr., 2000) depositando-se o conteúdo de cada palheta em tubo cônico de 1,5 mL, modelo Eppendorff® (Estados Unidos), para acondicionamento pré-análise em “banho-seco” a temperatura constante de 37°C.

Cada amostra foi descongelada em duplicata para as avaliações laboratoriais, tabulando-se as médias obtidas de acordo com o touro, meio diluidor e concentração de espermatozóides totais por mL para posteriores análises estatísticas.

4.1.7 – Avaliação Laboratorial do Sêmen Bovino Congelado

Os testes laboratoriais utilizados para o acesso a viabilidade do sêmen bovino congelado encontram-se discriminados nos tópicos a seguir.

4.1.7.1 – Análise Computadorizada do Movimento Espermático (CASA)

As amostras descongeladas foram submetidas à análise computadorizada do movimento espermático (CASA; APÊNDICE-3) através do aparelho Hamilton Thorn Research® Ivos-10 (Estados Unidos). O material previamente homogeneizado foi avaliado em câmara de Makler pré-aquecida a 37°C sendo observados 5 campos aleatórios para cada amostra e um número mínimo de 100 células por campo.

As variáveis de movimento espermático geradas pela técnica CASA e avaliados no presente estudo corresponderam a motilidade espermática total (MoT), motilidade progressiva (MP), velocidade média de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvelinear (VCL), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimentos de cauda (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e velocidade rápida (Rap).

4.1.7.2 – Teste de Termorresistência Rápido (TTR)

Todas as amostras foram submetidas ao teste de termorresistência rápido (TTR) em “banho-maria” a 46°C/30 minutos (BARNABÉ et al., 1980; Viana 2004), analisando-se, também pela técnica computadorizada, a motilidade espermática total ao final das avaliações.

4.1.7.3 – Determinação da Integridade de Membrana Plasmática (IMP)

Para a determinação da integridade de membrana plasmática, (IMP, %) foi utilizada a combinação de sondas fluorescentes (APÊNDICE-4) Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídeo (PI), segundo Harrison & Vickers (1990), adaptado por Viana (2004). Para tanto, retirou-se uma alíquota de 20 µL de sêmen de cada amostra avaliada, procedendo-se a pronta diluição em 40 µL de solução de citrato de sódio 2,94% previamente aquecido a 37°C. A solução originada foi adicionado 20 µL de solução de trabalho fluorescente, composta por 1,0 mL de citrato de sódio 2,94%, 20 µL de formol salino tamponado, 60 µL de PI e 20 µL de CFDA. As amostras coradas foram avaliadas sob lâmina e lamínula em aumento de 400 vezes através de microscopia de epifluorescência (LEIKA®, Alemanha), permitindo a diferenciação das células portadoras de membrana plasmática íntegra (coloração verde devido a marcação pela carboxifluoresceína) ou lesada (exibindo coloração vermelha característica da sonda iodeto de propídeo, fluorocromo exclusivamente permeável às células portadoras de membrana plasmática desestruturada). Para cada amostra foram avaliadas 100 células espermáticas.

4.1.7.4 – Swim-up

A metodologia utilizada para a seleção dos espermatozóides pelo teste de *swim-up* corresponde a técnica descrita por SOMFAI et al., (2002), apresentando algumas adaptações correspondentes às adequações às condições do laboratório CERAN, FMVZ-UNESP, Botucatu/SP (FIGURA-2):

- Descongelamento das amostras seminais em banho-maria a 46°C por 20 segundos (DELL'AQUA Jr., 2000);

- Deposição de 200 μL de sêmen em tudo cônico de 15 mL previamente preenchido com 1,5 mL de meio mDM (APÊNDICE-5), segundo Keskinetepe & Brackett (1996);
- Incubação do material em banho-maria a 37 - 38°C por 45 minutos, observando-se um ângulo de inclinação de 45° para os tubos;
- Retirada de 1 mL da solução sobrenadante;
- Centrifugação do sobrenadante a 300 \times g /10 minutos;
- Recuperação do “pellet” formado para realização de avaliações laboratoriais.

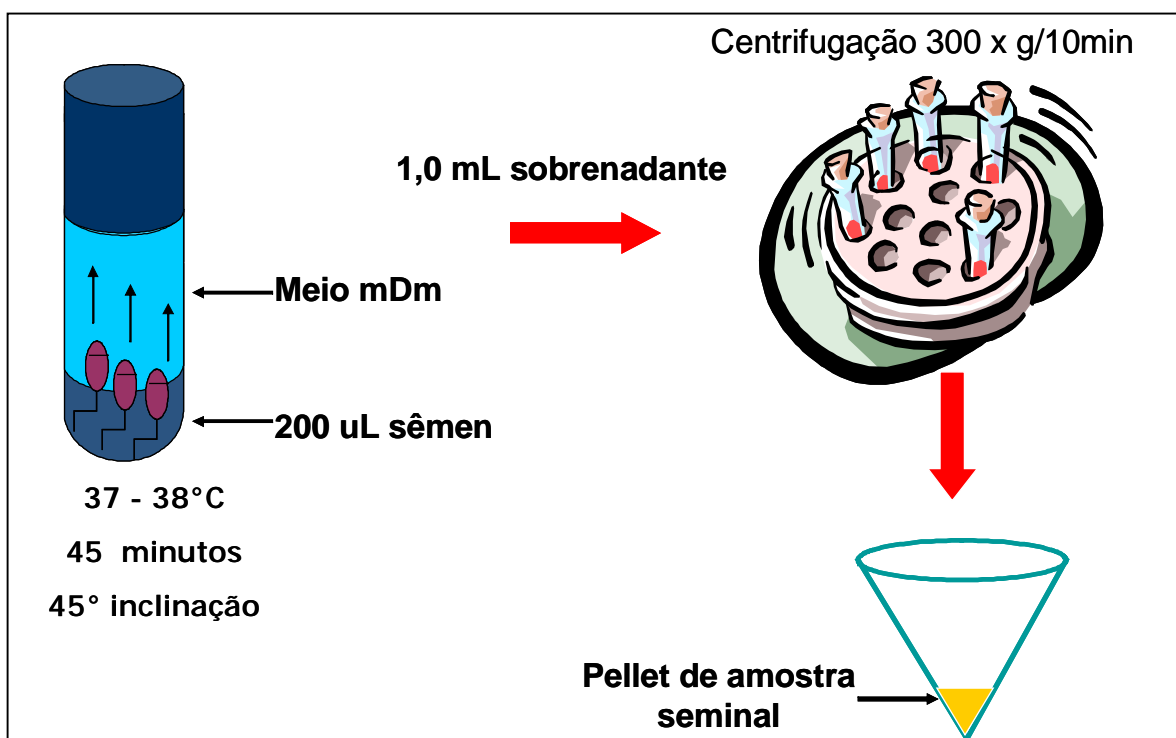


FIGURA-2: Esquematização simplificada dos procedimentos utilizados para a realização da técnica de *swim-up*.

A taxa de recuperação espermática pós *swim-up* foi obtida através da contagem celular direta em câmara hematocimétrica de Neubauer gerando os parâmetros concentração de células

recuperadas totais (espermatozoides/ μL) e o índice de recuperação em relação a dose inicial utilizada (%) para os ejaculados criopreservados em diluidor Tris-gema de ovo frutose ou MKA.

A integridade de membrana plasmática (%) foi determinada pela associação das sondas fluorescentes CFDA e PI, segundo metodologia exemplificada no tópico 4.1.7.3, a partir da contagem de 100 células espermáticas por amostra seminal.

4.1.8 – *Análise Estatística*

Para as análises estatísticas foi utilizado os softwares Graphpad InStat® 5.0 e BioEstat 3.0 (AYRES et al., 2003) em um delineamento casualizado de fatorial 2 x 4 (dois meios diluidores e quatro concentrações espermáticas), assumindo os meios de criopreservação como parcelas principais e as concentrações como sub-parcelas. Os dados laboratoriais foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação de normalidade ou homocedasticidade. Para as médias obtidas que apresentaram distribuição normal foram utilizados os testes paramétricos “T de Student” (comparação entre duas médias) e ANOVA (comparações entre três ou mais médias), considerando-se o nível de significância a 5% de probabilidade.

Para os resultados laboratoriais que não apresentaram distribuição normal e variâncias iguais (amostras independentes), ou que apresentaram um baixo número de repetições (“N” pequeno) aplicaram-se os testes não paramétricos Mann-Whitney (comparação entre duas médias) e Kruskal Wallis (para três ou mais médias), segundo Doria Filho (1999), considerando-se também o nível de significância a 5% de probabilidade.

4.2 – Experimento II: Influência do Meio Diluidor de Congelação e da Dose Inseminante sobre os Índices de Concepção de Vacas Nelore ou ½ Nelore Inseminadas em Tempo-Fixo.

4.2.1 – *Local da Pesquisa e Animais*

Para a segunda etapa experimental foram selecionados 7 dentre os 14 touros utilizados no Experimento I (baseando-se exclusivamente nas características de congelabilidade espermática), procedendo-se as coletas seminais por eletroejaculação e análise seminal imediata, conforme metodologia exemplificada nos tópicos 4.1.1 e 4.1.2.

4.2.2 – *Congelação e Descongelação das Amostras Seminais*

Visando-se a exclusão de possíveis efeitos individuais relacionados aos touros utilizados no experimento, optou-se pela realização de um “pool de sêmen”, evitando-se dessa forma a influencia do reprodutor sobre os índices médios de fertilidade obtidos nos trabalhos de IATF. Para tanto, os ejaculados dos sete touros selecionados a partir do Experimento I foram misturados integralmente executando-se a mesma metodologia apresentada nos itens 4.1.4. e 4.1.5, que compreendem a pré-diluição seminal para transporte e congelação espermática, respectivamente.

A semelhança do Experimento I, 8 grupos experimentais foram novamente formados representando o processamento do “pool de sêmen” em meio diluidor MKA nas concentrações de 12, 25, 50 e 100 milhões de espermatozóides totais por mL de meio (Grupos MKA 12, MKA 25, MKA 50 e MKA 100, respectivamente) observando-se o mesmo procedimento para as amostras criopreservadas em meio Tris-gema de ovo frutose (Grupos TRIS 12, TRIS 25, TRIS 50 e TRIS 100).

As amostras criopreservadas foram mantidas em botijão criobiológico por 3 dias para o início das avaliações laboratoriais, conduzidas a partir da descongelação a 46°C por 20 segundos (DELL'AQUA Jr., 2000).

4.2.3 – Avaliação Laboratorial do Sêmen Bovino Congelado

A similarmente a metodologia utilizada no Experimento I as amostras do “pool de sêmen” bovino foram avaliadas quanto aos padrões de movimento espermático pela técnica CASA, integridade de membrana plasmática através da associação das sondas fluorescentes CFDA + PI, teste de termorresistência rápido e técnica de separação por *swim-up*, sendo observadas as mesmas variáveis para cada análise conforme exemplificações nos tópicos 4.1.7.1, 4.1.7.2, 4.1.7.3 e 4.1.7.4. Todas as amostras do “pool” foram avaliadas em quadruplicata e as médias geradas tabuladas para processamento estatístico.

4.2.4 – Local e Vacas Utilizadas para a IATF

As amostras do “pool de sêmen” congelado foram utilizadas para a IATF de 475 “vacas paridas” (50 a 70 dias pós-parto) da raça Nelore ou suas cruzas, pertencentes a fazenda Bela Vista (Rio Verde de Mato Grosso, MS) durante a estação de monta de 2006. Todos os animais utilizados receberam manejo em pastagens naturais sob sistema de produção extensivo, sendo oferecido sal mineralizado *ad libitum*. Foi avaliado o escore de condição corporal (ECC, escala de 1 a 5) no momento da IATF para todas as vacas que fizeram parte do experimento, incluindo-se os dados obtidos para cada grupo (MKA vs TRIS vs concentrações) no modelo estatístico utilizado.

4.2.5 – Protocolo para a IATF

A FIGURA-3 abaixo ilustra o protocolo de sincronização do estro e ovulação utilizado na execução de todas as IATFs do presente experimento.

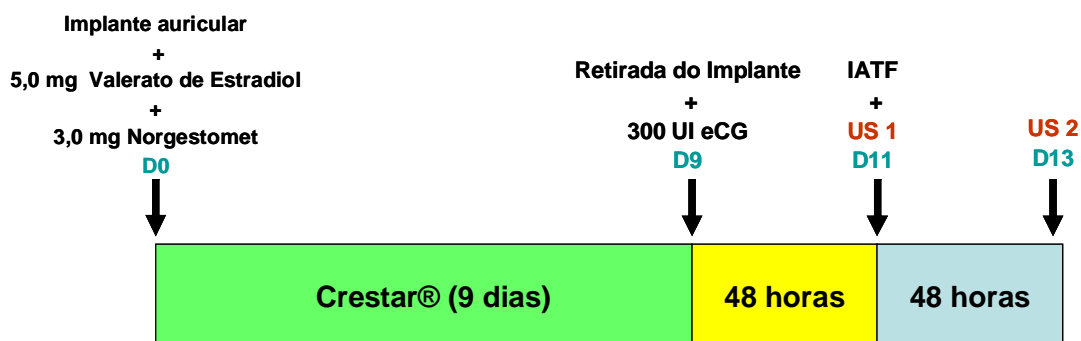


FIGURA-3: Sincronização do ciclo estral e ovulação para IATF. “D0”: inserção do implante auricular Crestar® (Akzo Nobel Ltda – Divisão Intervet®, Brasil) contendo 3,0 mg de Norgestomet (17a acetoxi-11 b-metil-19 norpregna-4-em-3,20 diona) e administração de 5,0 mg de Valerato de Estradiol e 3,0 mg de Norgestomet (Intervet®, Brasil). “D9”: retirada do implante e administração de 1,5 mL de Folligon® (eCG 200UI/mL, Intervet®, Brasil). “D11”: inseminação artificial em tempo-fixo (IATF). “US 1 e 2” = exames ultrassonográficos ovarianos.

4.2.6 – Exames Ultrassonográficos (US)

Como a hipótese levantada na pesquisa almejava identificar possíveis fatores seminais determinantes dos índices de fertilidade dos programas de IATF, tornou-se imprescindível que as vacas utilizadas no experimento apresentassem resposta ao protocolo, exibindo sincronização do ciclo estral e das ovulações, oferecendo, portanto, condições para que cada uma das metodologias de congelamento empregadas expressasse em condições de igualdade seu potencial de fertilidade agregado.

Nesse sentido foram instituídos exames ultrassonográficos seriados (aparelho Aloka Scanner 500, probe de 5,0 MHz) nos dias 11 (“D11”, representando o dia da IATF) e no dia 13 (“D13”,

décimo terceiro dia após o início do protocolo de sincronização), buscando-se, respectivamente, a observação da presença de um folículo pré-ovulatório no dia das inseminações e a constatação da ovulação da estrutura anteriormente visualizada (FIGURA-3).

Tendo em vista os objetivos do presente trabalho, apenas as vacas que exibiram ovulação foram consideradas para as análises estatísticas.

4.2.7 – Análise Estatística

As médias obtidas para cada variável de congelabilidade espermática foram avaliadas segundo o tópico 4.1.8 referente ao item Material e Métodos do Experimento I, realizando-se a análise de variância (ANOVA) e teste “T de Student” para as variáveis que apresentaram distribuição normal, e os testes Mann-Whitney e Kruskal Wallis para as análises não paramétricas, assumindo-se $p < 0,05$ como nível de significância.

Os resultados de concepção foram analisados através do programa computacional Proc Logistic incluído no Statistical Analysis System 9.1.3 (SAS Institute Inc., 1999). Como os resultados de concepção das vacas inseminadas implicam em resposta binária (prenhe ou vazia) foi realizada a análise de regressão logística múltipla, sendo incluídos no modelo o efeito do meio diluidor e da dose inseminante, admitindo-se o nível de significância de 5%.

Uma segunda análise de regressão logística foi conduzida incluindo no modelo estatístico apenas a variável meio diluidor e a interação diluidor vs concentração de espermatozóides inseminados, buscando-se a determinação do efeito do diluente sobre os índices de concepção animal. Novamente foi considerado o nível de significância de 5% de probabilidade.

5.0 – RESULTADOS

5.1 – Experimento I: Efeito do Meio Diluidor e da Concentração Espermática sobre a Viabilidade *in vitro* do Sêmen Bovino Congelado.

Os resultados apresentados para cada uma das variáveis do movimento espermático, motilidade total pós-teste de termorresistência rápido, integridade de membrana plasmática e seleção espermática por *swim-up*, de acordo com o meio diluidor de congelação e concentração espermática encontram-se sumarizados nas TABELAS-1 a 6.

De acordo com os dados apresentados nas TABELAS-1, 2, 3 e 4, foram observadas diferenças significativas para os valores médios de amplitude lateral de cabeça espermática, frequência de batimentos, retilinearidade e linearidade de acordo com o diluente de criopreservação utilizado mas independente da concentração espermática por palheta seminal.

Especificamente quanto a variável velocidade curvilínea ou real (VCL, $\mu\text{m/s}$), foram observados resultados significativamente superiores ($p < 0,05$) para as amostras espermáticas criopreservadas em diluidor TRIS em relação ao MKA (MKA 12 = $120,81 \pm 26,57$ vs TRIS 12 = $163,55 \pm 50,63$, $p = 0,0096$; MKA 25 = $121,12 \pm 22,85$ vs TRIS 25 = $150,91 \pm 37,81$, $p = 0,0181$; MKA 50 = $115,89 \pm 20,78$ vs TRIS 50 = $140,39 \pm 36,96$, $p = 0,0400$) exceto para as amostras processadas na concentração de 100 milhões de espermatozoides por mL (MKA 100 = $122,47 \pm 30,25$ vs TRIS 100 = $136,83 \pm 31,43$, $p = 0,2312$).

Não foram observadas diferenças significativas para as variáveis integridade de membrana plasmática pós-descongelação e viabilidade pós-teste de termorresistência rápido em função do meio diluidor de criopreservação ou da concentração de espermatozoides.

Não foram observadas diferenças significativas entre as variáveis de congelabilidade seminal para amostras criopreservadas no diluidor TRIS sob diferentes concentrações de células espermáticas. No entanto, quando utilizado o diluidor MKA, foram observadas diferenças para a retilinearidade (MKA 12 = $91,43 \pm 4,70^a$, MKA 25 = $90,71 \pm 4,18^a$, MKA50 = $87,64 \pm 5,53^{ac}$, MKA 100 = $84,86 \pm 5,10^c$; $p = 0,0028$) e linearidade de movimento espermático (MKA 12 = $69,07 \pm 8,90^a$, MKA 25 = $68,21 \pm 8,67^a$, MKA 50 = $63,93 \pm 9,22^{ac}$, MKA 100 = $59,36 \pm 7,78^c$, $p = 0,0168$) em função da concentração de espermatozóides presentes por amostra seminal (TABELAS-5 e 6).

Não foram encontradas diferenças significativas para nenhuma das variáveis geradas através da técnica de *swim-up* (integridade de membrana plasmática, concentração de espermatozóides recuperados em função da dose inicial e concentração de células recuperadas totais), independente do meio de criopreservação e da concentração espermática.

Os resultados obtidos para a integridade de membrana pós-descongelamento (IMPd) não diferiram significativamente dos observados para a mesma variável tomada após teste de *swim-up* (IMPs) para as concentrações 12 e 25 milhões de espermatozóides processados por palheta seminal (IMPd 12 vs IMPs 12, $p=0,3570$; IMPd 25 vs IMPs 25, $p=0,2549$), sendo observadas diferenças estatísticas apenas para 50 e 100 milhões de células totais (IMPd 50 vs IMPs 50, $p=0,0222$; IMPd 100 vs IMPs 100, $p=0,0348$). Não foram observadas diferenças significativas para os resultados agrupados totais obtidos para a IMPd e IMPs (FIGURA-4), independente da concentração espermática ou do meio diluidor ($p=0,1151$).

TABELA–1: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para as amostras criopreservadas em diluidor MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 12 milhões (12) de células totais por mililitro de meio.

<i>Variáveis</i>	<i>MKA 12</i>	<i>TRIS 12</i>	<i>P-valor</i>	<i>Resultados</i>
MoT (%)	58,29 \pm 10,51 ^a	62,14 \pm 15,86 ^a	0,4549	NS
MP (%)	49,57 \pm 13,44 ^a	44,86 \pm 15,10 ^a	0,3908	NS
VAP ($\mu\text{m/s}$)	88,56 \pm 19,25 ^a	100,59 \pm 30,12 ^a	0,2189	NS
VSL ($\mu\text{m/s}$)	81,63 \pm 19,79 ^a	81,24 \pm 21,94 ^a	0,9614	NS
VCL ($\mu\text{m/s}$)	120,81 \pm 26,57 ^a	163,55 \pm 50,63 ^b	0,0096	SD
ALH (μm)	4,62 \pm 1,38 ^a	6,73 \pm 1,52 ^b	0,0007	SD
BCF (Hz)	31,07 \pm 3,64 ^a	24,36 \pm 4,41 ^b	0,0002	SD
STR (%)	91,43 \pm 4,70 ^a	82,36 \pm 3,52 ^b	<0,0001	SD
LIN (%)	69,07 \pm 8,90 ^a	54,43 \pm 5,58 ^b	<0,0001	SD
Rap (%)	51,00 \pm 14,15 ^a	54,79 \pm 18,18 ^a	0,5440	NS
TTR (%)	13,00 \pm 14,82 ^a	21,00 \pm 22,66 ^a	0,279	NS
IMP (%)	31,71 \pm 9,38 ^a	33,86 \pm 8,43 ^a	0,5306	NS
IMP Swim-up (%)	27,79 \pm 15,81 ^a	35,00 \pm 17,26 ^a	0,2593	NS
Concentração (% dose)	25,53 \pm 26,05 ^a	15,83 \pm 13,31 ^a	0,3737	NS
Concentração (sptzs/ μL)	2857,14 \pm 3259,24 ^a	1971,43 \pm 1667,53 ^a	0,3690	NS

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS = sem diferença estatística.

TABELA–2: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para as amostras criopreservadas em diluidor MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 25 milhões (25) de células totais por mililitro de meio.

<i>Variáveis</i>	<i>MKA 25</i>	<i>TRIS 25</i>	<i>P-valor</i>	<i>Resultados</i>
MoT (%)	66,29 \pm 13,49 ^a	65,50 \pm 12,81 ^a	0,8757	NS
MP (%)	57,29 \pm 15,11 ^a	48,14 \pm 15,94 ^a	0,1314	NS
VAP ($\mu\text{m/s}$)	87,25 \pm 16,13 ^a	95,59 \pm 21,08 ^a	0,2503	NS
VSL ($\mu\text{m/s}$)	79,25 \pm 15,59 ^a	78,24 \pm 16,45 ^a	0,8683	NS
VCL ($\mu\text{m/s}$)	121,12 \pm 22,85 ^a	150,91 \pm 37,81 ^b	0,0181	SD
ALH (μm)	4,63 \pm 1,03 ^a	6,29 \pm 1,32 ^b	0,0009	SD
BCF (Hz)	31,74 \pm 4,79 ^a	25,25 \pm 5,69 ^b	0,0031	SD
STR (%)	90,71 \pm 4,18 ^a	83,29 \pm 4,30 ^b	<0,0001	SD
LIN (%)	68,21 \pm 8,67 ^a	55,86 \pm 6,59 ^b	0,0002	SD
Rap (%)	60,14 \pm 15,77 ^a	55,36 \pm 17,72 ^a	0,4571	NS
TTR (%)	21,79 \pm 19,94 ^a	27,50 \pm 21,23 ^a	0,4655	NS
IMP (%)	31,07 \pm 8,69 ^a	31,79 \pm 10,84 ^a	0,8489	NS
IMP Swim-up (%)	32,43 \pm 17,36 ^a	35,14 \pm 19,37 ^a	0,6963	NS
Concentração (% dose)	20,83 \pm 17,97 ^a	14,26 \pm 15,38 ^a	0,3081	NS
Concentração (sptzs/ μL)	5207,14 \pm 4492,29 ^a	3564,29 \pm 3845,60 ^a	0,3081	NS

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS = sem diferença estatística.

TABELA–3: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para as amostras criopreservadas em diluidor MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 50 milhões (50) de células totais por mililitro de meio.

<i>Variáveis</i>	<i>MKA 50</i>	<i>TRIS 50</i>	<i>P-valor</i>	<i>Resultados</i>
MoT (%)	66,14 \pm 11,57 ^a	70,29 \pm 14,74 ^a	0,4157	NS
MP (%)	53,93 \pm 13,65 ^a	48,29 \pm 16,31 ^a	0,3300	NS
VAP ($\mu\text{m/s}$)	80,59 \pm 4,65 ^a	87,75 \pm 21,27 ^a	0,3089	NS
VSL ($\mu\text{m/s}$)	71,00 \pm 14,88 ^a	70,54 \pm 15,59 ^a	0,9364	NS
VCL ($\mu\text{m/s}$)	115,89 \pm 20,78 ^a	140,39 \pm 36,96 ^b	0,0400	SD
ALH (μm)	4,93 \pm 1,04 ^a	6,31 \pm 1,13 ^b	0,0023	SD
BCF (Hz)	30,60 \pm 3,24 ^a	26,67 \pm 4,40 ^b	0,0096	SD
STR (%)	87,64 \pm 5,53 ^a	81,21 \pm 2,58 ^b	0,0005	SD
LIN (%)	63,93 \pm 9,22 ^a	54,93 \pm 6,18 ^b	0,0054	SD
Rap (%)	57,50 \pm 14,15 ^a	58,57 \pm 20,65 ^a	0,8740	NS
TTR (%)	19,79 \pm 24,35 ^a	21,50 \pm 20,41 ^a	0,8416	NS
IMP (%)	30,36 \pm 8,32 ^a	31,21 \pm 9,34 ^a	0,7996	NS
IMP Swim-up (%)	37,00 \pm 11,71 ^a	36,07 \pm 15,83 ^a	0,8613	NS
Concentração (% dose)	14,06 \pm 15,00 ^a	12,91 \pm 10,92 ^a	0,8195	NS
Concentração (sptzs/ μL)	7028,57 \pm 7497,84 ^a	6457,14 \pm 5461,43 ^a	0,8197	NS

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS = sem diferença estatística.

TABELA—4: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para as amostras criopreservadas em diluidor MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 100 milhões (100) de células totais por mililitro de meio.

<i>Variáveis</i>	<i>MKA 100</i>	<i>TRIS 100</i>	<i>P-valor</i>	<i>Resultados</i>
MoT (%)	63,93 \pm 14,05 ^a	58,86 \pm 11,45 ^a	0,3048	NS
MP (%)	48,57 \pm 14,80 ^a	40,07 \pm 13,88 ^a	0,1291	NS
VAP ($\mu\text{m/s}$)	82,23 \pm 19,86 ^a	83,67 \pm 20,10 ^a	0,8500	NS
VSL ($\mu\text{m/s}$)	72,33 \pm 17,44 ^a	68,68 \pm 13,04 ^a	0,5360	NS
VCL ($\mu\text{m/s}$)	122,47 \pm 30,25 ^a	136,83 \pm 31,43 ^a	0,2312	NS
ALH (μm)	5,34 \pm 1,10 ^a	6,15 \pm 0,61 ^b	0,0239	SD
BCF (Hz)	28,59 \pm 3,99 ^a	25,39 \pm 4,04 ^b	0,0441	SD
STR (%)	84,86 \pm 5,10 ^a	81,29 \pm 3,91 ^b	0,0475	SD
LIN (%)	59,36 \pm 7,78 ^a	52,79 \pm 4,49 ^b	0,0110	SD
Rap (%)	55,36 \pm 18,71 ^a	47,43 \pm 16,88 ^a	0,2497	NS
TTR (%)	20,21 \pm 27,73 ^a	17,79 \pm 18,28 ^a	0,7865	NS
IMP (%)	30,21 \pm 9,07 ^a	26,93 \pm 9,46 ^a	0,3569	NS
IMP Swim-up (%)	37,50 \pm 16,45 ^a	33,14 \pm 17,86 ^a	0,5079	NS
Concentração (% dose)	8,84 \pm 8,35 ^a	7,59 \pm 9,73 ^a	0,7197	NS
Concentração (sptzs/ μL)	8764,64 \pm 8424,44 ^a	7592,86 \pm 9728,27 ^a	0,7361	NS

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS = sem diferença estatística.

TABELA–5: Médias e desvios padrão apresentados para a motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para as amostras processadas em diluidor MKA nas concentrações de 12, 25, 50 ou 100 milhões (MKA 12, MKA 25, MKA 50 e MKA 100, respectivamente) de células totais por mL.

<i>Variáveis</i>	<i>MKA 12</i>	<i>MKA 25</i>	<i>MKA 50</i>	<i>MKA 100</i>	<i>P-valor</i>
MoT (%)	58,29 \pm 10,51 ^a	66,29 \pm 13,49 ^a	66,14 \pm 11,57 ^a	63,93 \pm 14,05 ^a	0,2986
MP (%)	49,57 \pm 13,44 ^a	57,29 \pm 15,11 ^a	53,93 \pm 13,65 ^a	48,57 \pm 14,80 ^a	0,3497
VAP ($\mu\text{m/s}$)	88,56 \pm 19,25 ^a	87,25 \pm 16,13 ^a	80,59 \pm 4,65 ^a	82,23 \pm 19,86 ^a	0,5752
VSL ($\mu\text{m/s}$)	81,63 \pm 19,79 ^a	79,25 \pm 15,59 ^a	71,00 \pm 14,88 ^a	72,33 \pm 17,44 ^a	0,2848
VCL ($\mu\text{m/s}$)	120,81 \pm 26,57 ^a	121,12 \pm 22,85 ^a	115,89 \pm 20,78 ^a	122,47 \pm 30,25 ^a	0,9100
ALH (μm)	4,62 \pm 1,38 ^a	4,63 \pm 1,03 ^a	4,93 \pm 1,04 ^a	5,34 \pm 1,10 ^a	0,3068
BCF (Hz)	31,07 \pm 3,64 ^a	31,74 \pm 4,79 ^a	30,60 \pm 3,24 ^a	28,59 \pm 3,99 ^a	0,1915
STR (%)	91,43 \pm 4,70 ^a	90,71 \pm 4,18 ^{ab}	87,64 \pm 5,53 ^{ab}	84,86 \pm 5,10 ^{bc}	0,0028
LIN (%)	69,07 \pm 8,90 ^a	68,21 \pm 8,67 ^{ab}	63,93 \pm 9,22 ^{ab}	59,36 \pm 7,78 ^{bc}	0,0168
Rap (%)	51,00 \pm 14,15 ^a	60,14 \pm 15,77 ^a	57,50 \pm 14,15 ^a	55,36 \pm 18,71 ^a	0,4795
TTR (%)	13,00 \pm 14,82 ^a	21,79 \pm 19,94 ^a	19,79 \pm 24,35 ^a	20,21 \pm 27,73 ^a	0,7331
IMP (%)	31,71 \pm 9,38 ^a	31,07 \pm 8,69 ^a	30,36 \pm 8,32 ^a	30,21 \pm 9,07 ^a	0,9677
IMP Swim-up (%)	27,79 \pm 15,81 ^a	32,43 \pm 17,36 ^a	37,00 \pm 11,71 ^a	37,50 \pm 16,45 ^a	0,3170
Concentração (% dose)	25,53 \pm 26,05 ^a	20,83 \pm 17,97 ^a	14,06 \pm 15,00 ^a	8,84 \pm 8,35 ^a	0,0852
Concentração (sptzs/ μL)	2857,14 \pm 3259,24 ^a	5207,14 \pm 4492,29 ^a	7028,57 \pm 7497,84 ^a	8764,64 \pm 8424,44 ^a	0,0686

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

TABELA–6: Médias e desvios padrão apresentados para a motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para as amostras processadas em diluidor TRIS nas concentrações de 12, 25, 50 ou 100 milhões (TRIS 12, TRIS 25, TRIS 50 e TRIS 100, respectivamente) de células totais por mL.

<i>Variáveis</i>	<i>TRIS 12</i>	<i>TRIS 25</i>	<i>TRIS 50</i>	<i>TRIS 100</i>	<i>P-valor</i>
MoT (%)	62,14 \pm 15,86 ^a	65,50 \pm 12,81 ^a	70,29 \pm 14,74 ^a	58,86 \pm 11,45 ^a	0,1689
MP (%)	44,86 \pm 15,10 ^a	48,14 \pm 15,94 ^a	48,29 \pm 16,31 ^a	40,07 \pm 13,88 ^a	0,4556
VAP ($\mu\text{m/s}$)	100,59 \pm 30,12 ^a	95,59 \pm 21,08 ^a	87,75 \pm 21,27 ^a	83,67 \pm 20,10 ^a	0,2329
VSL ($\mu\text{m/s}$)	81,24 \pm 21,94 ^a	78,24 \pm 16,45 ^a	70,54 \pm 15,59 ^a	68,68 \pm 13,04 ^a	0,1693
VCL ($\mu\text{m/s}$)	163,55 \pm 50,63 ^a	150,91 \pm 37,81 ^a	140,39 \pm 36,96 ^a	136,83 \pm 31,43 ^a	0,2932
ALH (μm)	6,73 \pm 1,52 ^a	6,29 \pm 1,32 ^a	6,31 \pm 1,13 ^a	6,15 \pm 0,61 ^a	0,6121
BCF (Hz)	24,36 \pm 4,41 ^a	25,25 \pm 5,69 ^a	26,67 \pm 4,40 ^a	25,39 \pm 4,04 ^a	0,6297
STR (%)	82,36 \pm 3,52 ^a	83,29 \pm 4,30 ^a	81,21 \pm 2,58 ^a	81,29 \pm 3,91 ^a	0,3892
LIN (%)	54,43 \pm 5,58 ^a	55,86 \pm 6,59 ^a	54,93 \pm 6,18 ^a	52,79 \pm 4,49 ^a	0,5577
Rap (%)	54,79 \pm 18,18 ^a	55,36 \pm 17,72 ^a	58,57 \pm 20,65 ^a	47,43 \pm 16,88 ^a	0,4396
TTR (%)	21,00 \pm 22,66 ^a	27,50 \pm 21,23 ^a	21,50 \pm 20,41 ^a	17,79 \pm 18,28 ^a	0,6596
IMP (%)	33,86 \pm 8,43 ^a	31,79 \pm 10,84 ^a	31,21 \pm 9,34 ^a	26,93 \pm 9,46 ^a	0,2852
IMP Swim-up (%)	35,00 \pm 17,26 ^a	35,14 \pm 19,37 ^a	36,07 \pm 15,83 ^a	33,14 \pm 17,86 ^a	0,9768
Concentração (% dose)	15,83 \pm 13,31 ^a	14,26 \pm 15,38 ^a	12,91 \pm 10,92 ^a	7,59 \pm 9,70 ^a	0,0596
Concentração (sptzs/ μL)	1971,43 \pm 1667,53 ^a	3564,29 \pm 3845,60 ^a	6457,14 \pm 5461,43 ^a	7592,86 \pm 9728,27 ^a	0,3418

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

TABELA-7: Valores agrupados (médias e desvios padrão) de acordo com o meio diluidor de congelamento (MKA ou Tris-gema), independentemente da concentração espermática por palheta de 0,5 mililitro.

<i>Variáveis</i>	<i>MKA</i>	<i>TRIS</i>	<i>P-valor</i>	<i>Resultados</i>
MoT (%)	63,66 ± 12,57 ^a	64,20 ± 14,10 ^a	0,8323	NS
MP (%)	52,34 ± 14,32 ^a	45,34 ± 15,28 ^b	0,0138	SD
VAP (µm/s)	84,66 ± 17,45 ^a	91,90 ± 23,80 ^a	0,0688	NS
VSL (µm/s)	76,05 ± 17,17 ^a	74,67 ± 17,41 ^a	0,6739	NS
VCL (µm/s)	120,08 ± 24,88 ^a	147,92 ± 40,13 ^b	<0,0001	SD
ALH (µm)	4,88 ± 1,15 ^a	6,37 ± 1,18 ^b	<0,0001	SD
BCF (Hz)	30,50 ± 4,03 ^a	25,42 ± 4,62 ^b	<0,0001	SD
STR (%)	88,66 ± 5,45 ^a	82,04 ± 3,64 ^b	<0,0001	SD
LIN (%)	65,14 ± 9,28 ^a	54,50 ± 5,72 ^b	<0,0001	SD
Rap (%)	56,00 ± 15,73 ^a	54,04 ± 18,37 ^a	0,5446	NS
TTR (%)	18,70 ± 21,89 ^a	21,95 ± 20,44 ^a	0,4186	NS
IMP (%)	30,84 ± 8,65 ^a	30,95 ± 9,63 ^a	0,9507	NS
IMP Swim-up (%)	33,68 ± 15,57 ^a	34,84 ± 17,17 ^a	0,7086	NS
Concentração (% dose)	16,67 ± 18,39 ^a	12,65 ± 12,57 ^a	0,3772	NS
Concentração (sptzs/µL)	5964,38 ± 6498,57 ^a	4896,43 ± 6218,71 ^a	0,2652	NS

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas encontradas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS = sem diferença estatística.

TABELA-8: Comparação entre a integridade de membrana plasmática pós-descongelamento (IMPd, %) e pós-prova de separação por *swim-up* (IMPs, %) em função da concentração espermática por palheta de 0,5 mL.

<i>Tratamento</i>	<i>IMPd</i>	<i>IMPs</i>	<i>P-valor</i>
12 x 10 ⁶ sptzs/mL	32.79 ± 8.82 ^a	31.39 ± 16.65 ^a	0,3570
25 x 10 ⁶ sptzs/mL	31.43 ± 9.65 ^a	33.79 ± 18.10 ^a	0,2549
50 x 10 ⁶ sptzs/mL	30.79 ± 8.69 ^a	36.54 ± 13.67 ^b	0,0222
100 x 10 ⁶ sptzs/mL	28.57 ± 9.25 ^a	35.32 ± 17.00 ^b	0,0348
Média ± Desvio Padrão	30,89 ± 9,11 ^a	34,26 ± 16,33 ^a	0,1151

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

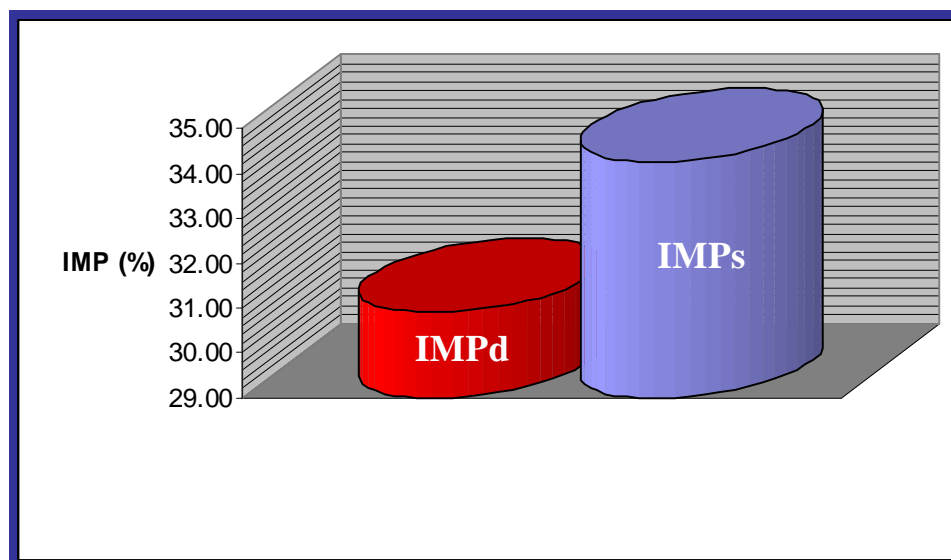


FIGURA-4: Integridade de membrana plasmática (%) pós-descongelamento (IMPd) e pós *swim-up* (IMPs) para amostras agrupadas dos 14 touros utilizados no Experimento I, independente da concentração espermática ou meio diluidor de criopreservação utilizado ($p=0,2687$).

5.2 – Experimento II: Influência do Meio Diluidor de Congelação e da Dose Inseminante sobre os Índices de Concepção de Vacas Nelore ou ½ Sangue Nelore Inseminadas em Tempo-Fixo.

5.2.1 – Avaliação Laboratorial do “Pool de Sêmen” Bovino Congelado

Os resultados referentes a avaliação *in vitro* da qualidade das amostras seminais destinadas às inseminações artificiais (“pool de sêmen”) encontram-se sumarizados nas TABELAS 9 a 14.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os parâmetros espermáticos avaliados para amostras processadas em diluidor MKA ou Tris-gema frutose quando a concentração espermática utilizada foi de 100 milhões de células por palheta.

Para as amostras congeladas com 12 milhões de células foram observadas diferenças estatísticas, respectivamente, para o diluidor MKA e TRIS, quanto a amplitude lateral de cabeça espermática ($4,35 \pm 0,30$ vs $6,45 \pm 0,60$), retilinearidade ($90,75 \pm 2,75$ vs $83,0 \pm 4,24$), linearidade de movimento ($68,25 \pm 3,50$ vs $53,5 \pm 5,00$), concentração de espermatozóides recuperados em função da dose inicial ($27,92 \pm 10,15$ vs $10,83 \pm 2,96$) e número de células espermática recuperadas totais ($3350,00 \pm 1217,92$ vs $1300,00 \pm 355,90$).

Já para as amostras criopreservadas na concentração de 25 milhões de células totais observou-se a diferença significativa entre os meios diluidores para a integridade de membrana plasmática pós *swim-up* (MKA = $48,25 \pm 3,77$ vs TRIS = $61,75 \pm 2,87$).

Para o “pool de sêmen” bovino congelado na concentração de 50 milhões de células espermáticas por mililitro de meio foram observadas diferenças significativas para a amplitude lateral de cabeça ($4,48 \pm 0,99$ vs $6,08 \pm 0,42$), frequência de batimentos flagelares ($33,03 \pm 3,54$ vs $27,58 \pm 1,75$) e índice de linearidade ($67,0 \pm 10,86$ vs $51,75 \pm 3,10$), respectivamente para os espermatozóides criopreservados em diluidor MKA ou TRIS.

A análise de variância conduzida para as amostras processadas em diferentes concentrações no diluidor TRIS revelou diferenças significativas para o número total de espermatozóides recuperados, enquanto que as partidas seminais criopreservadas em diluidor MKA diferiram estatisticamente em relação a proporção de células recuperadas em função do número de espermatozóides presentes por palheta francesa (TABELAS 13 e 14).

5.2.2 – Avaliação dos Índices de Fertilidade na IATF

A análise de regressão logística não revelou efeitos cúbicos ou quadráticos, sendo realizado o teste de regressão linear múltipla. Não foram observados efeitos lineares ou quadráticos para o escore de condição corporal das vacas inseminadas (ECC médio = 2,5) ou para o efeito do meio diluidor de criopreservação (TABELA-15). Efeito significativo ($p < 0,05$) foi observado para a concentração de espermatozóides inseminados sob as taxas de concepção animal.

Para os trabalhos de IATF foram utilizadas 475 vacas Nelore observando-se o índice médio de sincronização e ovulação de 85,89% e de concepção de 49,47% (235/475). Considerando-se apenas as vacas que apresentaram resposta ovulatória ao protocolo de sincronização, foco principal de nosso trabalho, o índice médio de concepção independente do diluente ou dose inseminante foi de 57,60% (235/408).

O modelo matemático para o cálculo do efeito linear da concentração de espermatozóides inseminados sobre os índices de concepção de vacas submetidas a IATF representa:

$$\hat{y} = \frac{e^{(0,0221 + 0,00678 \times \text{concentração espermiática})}}{1 + e^{(0,0221 + 0,00678 \times \text{concentração espermiática})}}$$

Onde: \hat{y} = probabilidade de concepção estimada; e = base dos logaritmos neperianos ou naturais.

Em função da tendência estatística observada para a influência dos meios diluidores utilizados no experimento quanto aos índices de concepção obtidos na IATF ($0,05 < p < 0,1$; TABELA-15) optou-se pela decomposição dos dados por regressão logística para análise individualizada da resposta dos diluentes MKA ou TRIS em função do aumento da dose inseminante. Através do novo modelo estatístico (TABELA-16) foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para a interação da concentração espermática em função do diluidor TRIS, denotando que os índices de concepção de vacas inseminadas em tempo-fixo são funções lineares da interação TRIS/dose inseminante (FIGURA-5).

TABELA–9: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para o “pool de sêmen” criopreservado em diluidor MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 12 milhões (12) de células totais por mililitro de meio.

<i>Variáveis</i>	<i>Pool MKA 12</i>	<i>Pool TRIS 12</i>	<i>P-valor</i>	<i>Resultados</i>
MoT (%)	71,0 \pm 7,79 ^a	62,25 \pm 11,98 ^a	0,3429	NS
MP (%)	64,0 \pm 4,97 ^a	48,75 \pm 15,17 ^a	0,2000	NS
VAP ($\mu\text{m/s}$)	90,05 \pm 5,65 ^a	94,15 \pm 6,65 ^a	0,4857	NS
VSL ($\mu\text{m/s}$)	81,45 \pm 3,21 ^a	76,1 \pm 2,63 ^a	0,1143	NS
VCL ($\mu\text{m/s}$)	127,73 \pm 10,61 ^a	153,45 \pm 13,58 ^a	0,1143	NS
ALH (μm)	4,35 \pm 0,30 ^a	6,45 \pm 0,60 ^b	0,0286	SD
BCF (Hz)	33,85 \pm 2,17 ^a	28,45 \pm 3,81 ^a	0,1143	NS
STR (%)	90,75 \pm 2,75 ^a	83,0 \pm 4,24 ^b	0,0286	SD
LIN (%)	68,25 \pm 3,50 ^a	53,5 \pm 5,00 ^b	0,0286	SD
Rap (%)	65,75 \pm 8,66 ^a	55,0 \pm 14,26 ^a	0,4857	NS
TTR (%)	45,0 \pm 25,91 ^a	29,5 \pm 18,52 ^a	0,4857	NS
IMP (%)	37,5 \pm 4,73 ^a	30,75 \pm 9,22 ^a	0,2000	NS
IMP Swim-up (%)	56,00 \pm 8,79 ^a	51,00 \pm 5,29 ^a	0,4857	NS
Concentração (% dose inicial)	27,92 \pm 10,15 ^a	10,83 \pm 2,96 ^b	0,0286	SD
Concentração (sptzs/ μL)	3350,00 \pm 1217,92 ^a	1300,00 \pm 355,90 ^b	0,0286	SD

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS = sem diferença estatística.

TABELA–10: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para o “pool de sêmen” criopreservado em diluidor MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 25 milhões (25) de células totais por mililitro de meio.

<i>Variáveis</i>	<i>Pool MKA 25</i>	<i>Pool TRIS 25</i>	<i>P-valor</i>	<i>Resultados</i>
MoT (%)	66,25 \pm 2,75 ^a	66,25 \pm 3,10 ^a	0,9999	NS
MP (%)	56,5 \pm 4,12 ^a	49,5 \pm 7,55 ^a	0,2000	NS
VAP ($\mu\text{m/s}$)	87,95 \pm 3,34 ^a	89,13 \pm 4,97 ^a	0,9999	NS
VSL ($\mu\text{m/s}$)	76,65 \pm 3,83 ^a	72,4 \pm 2,90 ^a	0,1143	NS
VCL ($\mu\text{m/s}$)	129,33 \pm 15,70 ^a	146,18 \pm 15,06 ^a	0,1143	NS
ALH (μm)	4,8 \pm 1,02 ^a	5,93 \pm 0,80 ^a	0,1143	NS
BCF (Hz)	34,2 \pm 4,87 ^a	28,33 \pm 3,74 ^a	0,1143	NS
STR (%)	87,5 \pm 6,61 ^a	81,75 \pm 5,91 ^a	0,2000	NS
LIN (%)	63,5 \pm 9,40 ^a	53,0 \pm 7,75 ^a	0,1143	NS
Rap (%)	58,75 \pm 9,36 ^a	60,0 \pm 3,56 ^a	0,9999	NS
TTR (%)	31,75 \pm 30,38 ^a	22,0 \pm 20,80 ^a	0,4857	NS
IMP (%)	35,5 \pm 6,61 ^a	39,75 \pm 17,48 ^a	0,8857	NS
IMP Swim-up (%)	48,25 \pm 3,77 ^a	61,75 \pm 2,87 ^b	0,0286	SD
Concentração (% dose inicial)	12,90 \pm 4,97 ^a	14,50 \pm 7,10 ^a	0,6857	NS
Concentração (sptzs/ μL)	3225,00 \pm 1241,97 ^a	3625,0 \pm 1774,59 ^a	0,6857	NS

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS = sem diferença estatística.

TABELA–11: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para o “pool de sêmen” criopreservado em diluente MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 50 milhões (50) de células totais por mililitro de meio.

<i>Variáveis</i>	<i>Pool MKA 50</i>	<i>Pool TRIS 50</i>	<i>P-valor</i>	<i>Resultados</i>
MoT (%)	77,75 \pm 5,12 ^a	65,25 \pm 6,95 ^a	0,0571	NS
MP (%)	64,0 \pm 8,72 ^a	48,25 \pm 4,35 ^a	0,0571	NS
VAP ($\mu\text{m/s}$)	87,30 \pm 4,22 ^a	80,23 \pm 9,29 ^a	0,3429	NS
VSL ($\mu\text{m/s}$)	76,4 \pm 5,92 ^a	64,95 \pm 7,01 ^a	0,1143	NS
VCL ($\mu\text{m/s}$)	119,25 \pm 9,97 ^a	131,85 \pm 18,03 ^a	0,6857	NS
ALH (μm)	4,48 \pm 0,99 ^a	6,08 \pm 0,42 ^b	0,0286	SD
BCF (Hz)	33,03 \pm 3,54 ^a	27,58 \pm 1,75 ^b	0,0286	SD
STR (%)	88,25 \pm 5,38 ^a	81,00 \pm 2,94 ^a	0,0571	NS
LIN (%)	67,0 \pm 10,86 ^a	51,75 \pm 3,10 ^b	0,0286	SD
Rap (%)	68,5 \pm 8,27 ^a	56,0 \pm 6,00 ^a	0,0571	NS
TTR (%)	48,0 \pm 15,06 ^a	25,75 \pm 20,79 ^a	0,3429	NS
IMP (%)	43,0 \pm 6,16 ^a	36,5 \pm 5,00 ^a	0,2000	NS
IMP Swim-up (%)	49,25 \pm 6,95 ^a	50,5 \pm 12,40 ^a	0,6857	NS
Concentração (% dose inicial)	9,60 \pm 4,97 ^a	9,00 \pm 3,56 ^a	0,8857	NS
Concentração (sptzs/ μL)	4800,00 \pm 2487,30 ^a	4500,0 \pm 1779,51 ^a	0,8857	NS

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS = sem diferença estatística.

TABELA–12: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para o “pool de sêmen” criopreservado em diluente MKA ou Tris-gema (TRIS) na concentração de 100 milhões (100) de células totais por mililitro de meio.

<i>Variáveis</i>	<i>Pool MKA 100</i>	<i>Pool TRIS 100</i>	<i>P-valor</i>	<i>Resultados</i>
MoT (%)	60,75 \pm 5,38 ^a	63,50 \pm 1,29 ^a	0,3429	NS
MP (%)	48,75 \pm 4,86 ^a	47,75 \pm 2,87 ^a	0,8857	NS
VAP ($\mu\text{m/s}$)	84,43 \pm 6,38 ^a	88,70 \pm 8,91 ^a	0,4857	NS
VSL ($\mu\text{m/s}$)	72,58 \pm 7,12 ^a	72,15 \pm 4,72 ^a	0,9999	NS
VCL ($\mu\text{m/s}$)	124,65 \pm 7,31 ^a	145,03 \pm 31,24 ^a	0,4857	NS
ALH (μm)	5,25 \pm 0,29 ^a	6,00 \pm 0,90 ^a	0,3429	NS
BCF (Hz)	28,58 \pm 5,72 ^a	27,08 \pm 3,99 ^a	0,6857	NS
STR (%)	84,5 \pm 3,70 ^a	79,5 \pm 8,35 ^a	0,3429	NS
LIN (%)	59,75 \pm 4,27 ^a	53,25 \pm 8,42 ^a	0,3429	NS
Rap (%)	57,25 \pm 4,99 ^a	60,75 \pm 9,00 ^a	0,6857	NS
TTR (%)	33,0 \pm 26,80 ^a	47,50 \pm 10,28 ^a	0,4857	NS
IMP (%)	31,25 \pm 2,99 ^a	34,25 \pm 7,68 ^a	0,3429	NS
IMP Swim-up (%)	40,75 \pm 3,59 ^a	42,75 \pm 17,75 ^a	0,8857	NS
Concentração (% dose inicial)	7,43 \pm 4,35 ^a	8,18 \pm 4,25 ^a	0,8857	NS
Concentração (sptzs/ μL)	7425,00 \pm 4354,60 ^a	8175,0 \pm 4247,65 ^a	0,8857	NS

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS = sem diferença estatística.

TABELA–13: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para o “pool de sêmen” bovino criopreservado em diluente MKA nas concentrações de 12, 25, 50 ou 100 milhões (MKA 12, MKA 25, MKA 50 e MKA 100, respectivamente) de células totais por mililitro de meio.

<i>Variáveis</i>	<i>MKA 12</i>	<i>MKA 25</i>	<i>MKA 50</i>	<i>MKA 100</i>
*MoT (%)	71,0 \pm 7,79 ^{ab}	66,25 \pm 2,75 ^{ab}	77,75 \pm 5,12 ^{bc}	60,75 \pm 5,38 ^a
MP (%)	64,0 \pm 4,97 ^a	56,5 \pm 4,12 ^a	64,0 \pm 8,72 ^a	48,75 \pm 4,86 ^a
VAP ($\mu\text{m/s}$)	90,05 \pm 5,65 ^a	87,95 \pm 3,34 ^a	87,30 \pm 4,22 ^a	84,43 \pm 6,38 ^a
VSL ($\mu\text{m/s}$)	81,45 \pm 3,21 ^a	76,65 \pm 3,83 ^a	76,4 \pm 5,92 ^a	72,58 \pm 7,12 ^a
VCL ($\mu\text{m/s}$)	127,73 \pm 10,61 ^a	129,33 \pm 15,70 ^a	119,25 \pm 9,97 ^a	124,65 \pm 7,31 ^a
ALH (μm)	4,35 \pm 0,30 ^a	4,8 \pm 1,02 ^a	4,48 \pm 0,99 ^a	5,25 \pm 0,29 ^a
BCF (Hz)	33,85 \pm 2,17 ^a	34,2 \pm 4,87 ^a	33,03 \pm 3,54 ^a	28,58 \pm 5,72 ^a
STR (%)	90,75 \pm 2,75 ^a	87,5 \pm 6,61 ^a	88,25 \pm 5,38 ^a	84,5 \pm 3,70 ^a
LIN (%)	68,25 \pm 3,50 ^a	63,5 \pm 9,40 ^a	67,0 \pm 10,86 ^a	59,75 \pm 4,27 ^a
Rap (%)	65,75 \pm 8,66 ^a	58,75 \pm 9,36 ^a	68,5 \pm 8,27 ^a	57,25 \pm 4,99 ^a
TTR (%)	45,0 \pm 25,91 ^a	31,75 \pm 30,38 ^a	48,0 \pm 15,06 ^a	33,0 \pm 26,80 ^a
IMP (%)	37,5 \pm 4,73 ^a	35,5 \pm 6,61 ^a	43,0 \pm 6,16 ^a	31,25 \pm 2,99 ^a
IMP Swim-up (%)	56,00 \pm 8,79 ^a	48,25 \pm 3,77 ^a	49,25 \pm 6,95 ^a	40,75 \pm 3,59 ^a
**Concentração (% dose)	27,92 \pm 10,15 ^a	12,90 \pm 4,97 ^{bc}	9,60 \pm 4,97 ^{bc}	7,43 \pm 4,35 ^c
Concentração (sptzs/ μL)	3350 \pm 1217,92 ^a	3225 \pm 1241,97 ^a	4800 \pm 2487,30 ^a	7425 \pm 4354,60 ^a

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). * $p = 0,0064$; ** $p = 0,0184$.

TABELA–14: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT, %), progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade de movimento (LIN, %), porcentagem de espermatozoides apresentando movimento rápido (Rap, %), motilidade espermática total pós-teste de termorresistência rápido (TTR, %), integridade de membrana plasmática pós-descongelamento e pós *swim-up* (IMP, %), concentração de espermatozoides recuperados em relação a dose inicial (%) e número de espermatozoides recuperados totais (sptzs/ μL) para o “pool de sêmen” bovino criopreservado em diluente TRIS nas concentrações de 12, 25, 50 ou 100 milhões (TRIS 12, TRIS 25, TRIS 50 e TRIS 100, respectivamente) de células totais por mililitro de meio.

<i>Variável</i>	<i>TRIS 12</i>	<i>TRIS 25</i>	<i>TRIS 50</i>	<i>TRIS 100</i>
MoT (%)	62,25 \pm 11,98 ^a	66,25 \pm 3,10 ^a	65,25 \pm 6,95 ^a	63,50 \pm 1,29 ^a
MP (%)	48,75 \pm 15,17 ^a	49,5 \pm 7,55 ^a	48,25 \pm 4,35 ^a	47,75 \pm 2,87 ^a
VAP ($\mu\text{m/s}$)	94,15 \pm 6,65 ^a	89,13 \pm 4,97 ^a	80,23 \pm 9,29 ^a	88,70 \pm 8,91 ^a
VSL ($\mu\text{m/s}$)	76,1 \pm 2,63 ^a	72,4 \pm 2,90 ^a	64,95 \pm 7,01 ^a	72,15 \pm 4,72 ^a
VCL ($\mu\text{m/s}$)	153,45 \pm 13,58 ^a	146,18 \pm 15,06 ^a	131,85 \pm 18,03 ^a	145,03 \pm 31,24 ^a
ALH (μm)	6,45 \pm 0,60 ^a	5,93 \pm 0,80 ^a	6,08 \pm 0,42 ^a	6,00 \pm 0,90 ^a
BCF (Hz)	28,45 \pm 3,81 ^a	28,33 \pm 3,74 ^a	27,58 \pm 1,75 ^a	27,08 \pm 3,99 ^a
STR (%)	83,0 \pm 4,24 ^a	81,75 \pm 5,91 ^a	81,00 \pm 2,94 ^a	79,5 \pm 8,35 ^a
LIN (%)	53,5 \pm 5,00 ^a	53,0 \pm 7,75 ^a	51,75 \pm 3,10 ^a	53,25 \pm 8,42 ^a
Rap (%)	55,0 \pm 14,26 ^a	60,0 \pm 3,56 ^a	56,0 \pm 6,00 ^a	60,75 \pm 9,00 ^a
TTR (%)	29,5 \pm 18,52 ^a	22,0 \pm 20,80 ^a	25,75 \pm 20,79 ^a	47,50 \pm 10,28 ^a
IMP (%)	30,75 \pm 9,22 ^a	39,75 \pm 17,48 ^a	36,5 \pm 5,00 ^a	34,25 \pm 7,68 ^a
IMP Swim-up (%)	51,00 \pm 5,29 ^a	61,75 \pm 2,87 ^a	50,5 \pm 12,40 ^a	42,75 \pm 17,75 ^a
Concentração (% dose)	10,83 \pm 2,96 ^a	14,50 \pm 7,10 ^a	9,00 \pm 3,56 ^a	8,18 \pm 4,25 ^a
*Concentração (sptzs/ μL)	1300 \pm 355,90 ^a	3625 \pm 1774,59 ^{bc}	4500 \pm 1779,51 ^{bc}	8175 \pm 4247,65 ^c

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). * $p = 0,0304$.

TABELA–15: Efeito das variáveis meio diluidor de criopreservação e concentração de espermatozóides inseminados sobre os índices médios de concepção de vacas “ovuladas” e inseminadas em tempo-fixo.

Parâmetros	Estimativa	P-valor	Resultados
Meio diluidor	0,5908	0,0836	NS
Concentração espermática	0,0125	0,0132	SD
Escore de Condição Corporal	0,4109	0,2814	NS
Concentração vs meio	-0,0104	0,1232	NS

TABELA–16: Efeito das variáveis meio diluidor de criopreservação e da interação dose inseminante/meio diluidor em relação aos índices médios de concepção de vacas “ovuladas” e inseminadas em tempo-fixo.

Parâmetros		Estimativa	P-valor	Resultados
Meio diluidor		0,6229	0,0667	NS
Concentração espermática em função do meio diluidor	Meio MKA	0,0019	0,6781	NS
	Meio TRIS	0,0125	0,0126	SD

TABELA–17: Índices médios de concepção agrupados para vacas inseminadas em tempo-fixo em função da dose inseminante (12 a 100 milhões de espermatozóides por mililitro de meio), independentemente do diluidor de criopreservação utilizado.

Tratamento	N	Prenhez (n)	Concepção (%)
12 x 10 ⁶ sptzs/mL	116	60	51,72
25 x 10 ⁶ sptzs/mL	106	59	55,66
50 x 10 ⁶ sptzs/mL	112	67	59,82
100 x 10 ⁶ sptzs/mL	74	49	66,22
X	408	235	57,60

TABELA–18: Índices médios de concepção observados para vacas Nelore inseminadas em tempo-fixo de acordo com a meio diluidor utilizado na criopreservação espermática e da dose inseminante (12 a 100 milhões de espermatozóides por mililitro de meio).

	MKA		TRIS	
	N	Concepção Ovuladas (%)	N	Concepção Ovuladas (%)
12 x 10 ⁶ sptzs/mL	59	57,63	57	45,61
25 x 10 ⁶ sptzs/mL	63	60,31	43	48,84
50 x 10 ⁶ sptzs/mL	54	59,26	58	60,34
100 x 10 ⁶ sptzs/mL	40	62,50	34	70,59
média	(n = 216)	59, 72	(n=192)	60,41

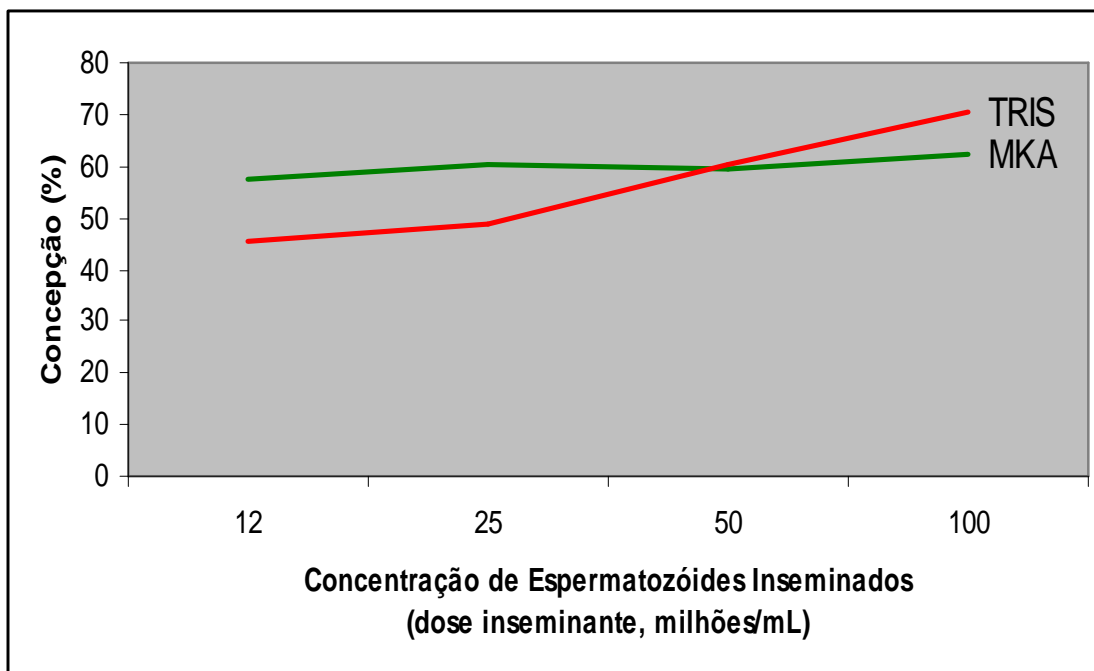


FIGURA-5: Relação entre o aumento da dose inseminante e os índices médios de concepção obtidos para vacas inseminadas em tempo-fixo de acordo com o meio de criopreservação utilizado ($p=0,0667$).

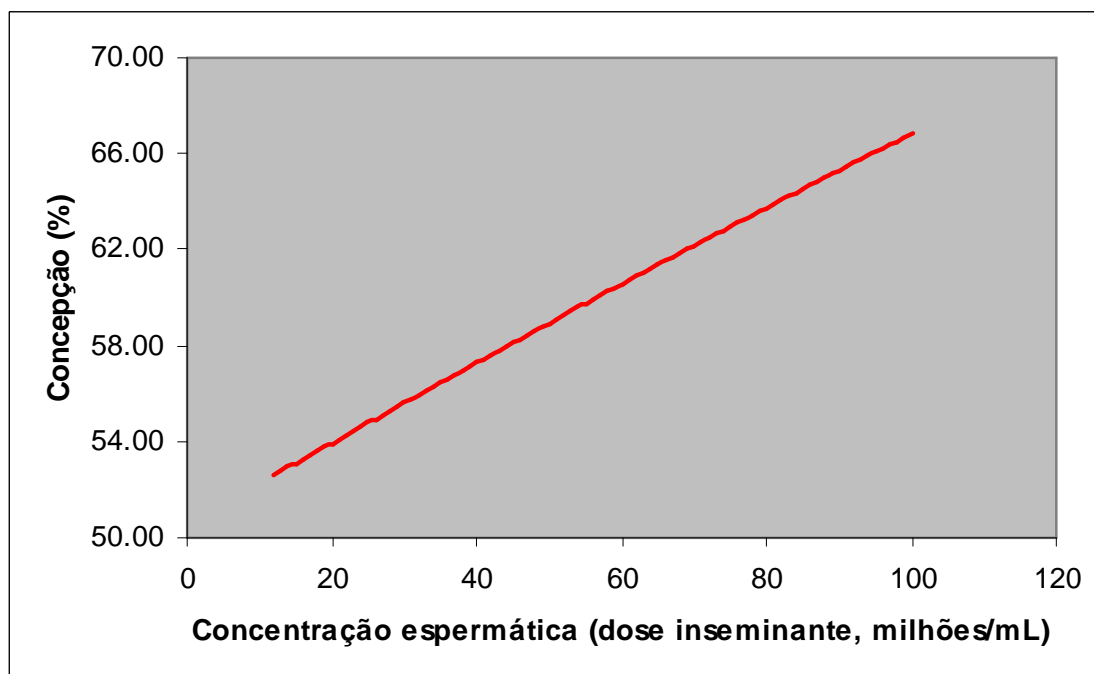


FIGURA-6: Efeito compensatório ($p<0,05$) da dose inseminante sobre os índices médios de concepção obtidos para vacas sincronizadas e inseminadas em tempo-fixo.

6.0 – DISCUSSÃO

6.1 – No Experimento I foi avaliado o efeito do meio diluidor e de diferentes concentrações espermáticas por palheta de 0,5 mL sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen bovino congelado de 14 touros da raça Nelore.

Considerando-se a complexidade que envolve os processos reprodutivos, torna-se improvável que a avaliação de um único atributo espermático possa refletir a real capacidade de fertilização de uma amostra seminal (HALLAP, 2005). Diversos parâmetros classicamente utilizados na rotina de análise laboratorial do sêmen congelado, como a avaliação subjetiva da motilidade espermática e morfologia dos espermatozóides, apresentam um limitado valor para o estudo do efeito de diferentes meios diluidores sobre a viabilidade espermática (GIL et al., 2000).

Nesse sentido, apesar da controvérsia existente a respeito da correlação da motilidade espermática com os índices de fertilidade *in vivo*, a análise de múltiplos atributos de movimento espermático por meio da técnica CASA e determinação da viabilidade espermática através de técnicas de análise de membranas citoplasmáticas, testes funcionais de separação e provas de incubação podem agregar maior sensibilidade a avaliação *in vitro* do sêmen bovino.

Diversos fatores podem afetar a fertilidade dos espermatozóides bovinos congelados, influenciando, conseqüentemente, nos resultados obtidos durante a realização das avaliações laboratoriais da qualidade espermática. Fatores como o tipo de processamento espermático, incluindo os diluentes de congelação utilizados e a concentração de espermatozóides por palheta podem exercer grande influência sobre os índices de congelabilidade e fertilidade, condições que representam o objetivo desse estudo.

Internacionalmente adota-se o valor de 50% de células móveis totais pós-descongelação como parâmetro mínimo de qualidade espermática (ZHANG et al., 1999). Nesse contexto ambos os

diluidores testados mostraram-se eficientes para o processamento do sêmen bovino quando tomada apenas a motilidade total pós-descongelção como parâmetro de qualidade seminal (MKA 12= 58,29 ± 10,51, MKA 25 = 66,29 ± 13,49, MKA 50 = 66,14 ± 11,57, MKA 100 = 63,93 ± 14,05; TRIS 12 = 62,14 ± 15,86, TRIS 25 = 65,50 ± 12,81, TRIS 50 = 70,29 ± 14,74, TRIS 100 = 58,86 ± 11,45, respectivamente para amostras criopreservadas nas concentrações de 12, 25, 50 e 100 milhões de espermatozoides totais por mililitro de meio), não sendo observadas diferenças significativas entre os diferentes meios ou entre as concentrações espermáticas avaliadas. Os resultados obtidos encontram-se em conformidade com os reportados por Crespilho et al., (2006)^b que não observaram diferença significativa para motilidade total pós-descongelção apresentada por espermatozoides bovinos criopreservados nos diluidores MKA ou Tris-gema frutose.

A porcentagem de espermatozoides exibindo movimento progressivo (MP, %) representa um índice classicamente utilizado como parâmetro de qualidade para amostras espermáticas de diversas espécies animais. Além de característica de movimento altamente desejável para amostras de sêmen bovino congelado, reporta-se a associação dos índices de MP com determinadas características estruturais dos espermatozoides. Segundo Barnabé et al., (1981) quanto maior o índice de MP inicial das amostras espermáticas menor é a incidência de acrossomos anormais, relatando uma correlação significativa ($p < 0,01$) entre o padrão de movimento e a preservação da estrutura espermática.

No presente estudo não foram observadas diferenças significativas para a MP entre os oito grupo experimentais estudados, indicando que tal parâmetro não sofreu influência da concentração de espermatozoides processados por palheta. No entanto a pronunciada diferença numérica observada entre as médias apresentadas nas TABELAS 1, 2, 3 e 4 sugerem que a porcentagem de espermatozoides progressivos de uma amostra pode ser influenciada pelo meio diluidor de criopreservação.

Para averiguação dessa hipótese a TABELA-7 apresenta os dados agrupados dos 8 grupos experimentais levando-se em consideração apenas o diluente de congelação, independente da concentração espermática (reunião dos valores obtidos para as concentrações de 12, 25, 50 e 100 milhões de espermatozóides por mL de acordo com o meio utilizado). Observa-se nesse caso a diferença significativa para o MP (MKA = $52,34 \pm 14,32$ vs TRIS = $45,34 \pm 15,28$, $p = 0,0138$) demonstrando-se a influência do meio de criopreservação sobre a progressividade de movimento dos espermatozóides bovinos.

Acredita-se que as diferenças significativas não evidenciadas entre os grupos experimentais analisados individualmente não estejam relacionadas à sensibilidade da técnica de avaliação computadorizada do movimento espermático, visto que, segundo Farrel et al., (1998) o MP representa um dos parâmetros de maior repetibilidade quando analisado através da técnica CASA. O baixo número de repetições realizadas para cada concentração espermática ocasionou maior dificuldade na análise dos resultados, situação contornada pelo agrupamento dos valores apenas pelo meio diluidor de congelação.

Em concordância aos resultados apresentados, Hirai et al., (1997) indicam uma influência significativa do meio diluidor sobre o índice de espermatozóides desempenhando MP, sendo observada a queda gradativa do padrão de movimento de acordo com o aumento da viscosidade do meio. Em nosso trabalho como ambos os meios de criopreservação utilizados sofreram centrifugações durante a confecção (processo que favorece a avaliação laboratorial do sêmen), possíveis diferenças entre os índices de progressividade podem ter sido amenizadas em virtude da diminuição da viscosidade dos diluidores, situação que associada ao baixo número de repetições justificam a dificuldade para a comprovação estatística das diferenças numéricas observadas.

Em relação às variáveis velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade curvilínea ou real (VCL, $\mu\text{m/s}$), parâmetros avaliados através da técnica CASA

que expressam a velocidade espermática ao longo de sua trajetória, foram observadas diferenças significativas apenas para o VCL em função do meio diluidor utilizado nas concentrações de 12 (MKA 12 = $120,81 \pm 26,57$ vs TRIS 12 = $163,55 \pm 50,63$), 25 (MKA 25 = $121,12 \pm 22,85$ vs TRIS 25 = $150,91 \pm 37,81$) e 50 milhões de espermatozóides totais por mL (MKA 50 = $121,12 \pm 22,85$ vs TRIS 50 = $150,91 \pm 37,81$). Os resultados apontam para uma maior velocidade curvilínea ou real pós-descongelamento para os espermatozóides criopreservados em diluidor Tris-gema de ovo frutose.

A relação entre os parâmetros de velocidade espermática e os índices de fertilidade permanece sem uma definição clara na literatura. Verstegen et al., (2002) indicam que amostras espermáticas apresentando valores significativamente maiores de VAP, VSL, e VCL produzem maiores taxas de fertilização (acima de 50% de ovócitos fertilizados) em relação a partidas seminais apresentando baixos índices de velocidade.

Correlações significativas ($p < 0,05$) são reportadas para as taxas de clivagens de ovócitos fertilizados *in vitro* e os valores médios de VCL obtidos a partir de amostras seminais de diferentes touros (HWANG et al., 1999). Associação positiva é observada também para valores aumentados de VCL e taxa de penetração espermática nas células do *cumulus* de ovócitos de hamsters (OLDS-CLARKE, 1996), indicando que tal parâmetro de velocidade dos espermatozóides apresenta grande importância para a determinação dos resultados da fertilização *in vitro*.

Farrel et al., (1998) analisando dados de 211.956 serviços observaram correlação significativa ($r = 0,67$) dos valores agrupados de VCL e motilidade progressiva pós-descongelamento com os resultados de concepção na inseminação artificial em bovinos.

Em contrapartida, Hallap (2005) indica que a velocidade média de trajeto desempenhada pelos espermatozóides bovinos pós-descongelamento representa a variável de maior correlação com os índices de fertilidade *in vivo* ($r = 0,479$, $p = 0,044$) quando tomada isoladamente.

Trabalhando com sêmen bovino refrigerado Tardiff et al., (1997) observaram um maior declínio para os padrões de velocidade espermática ao longo do período de 3 dias de estocagem em relação ao parâmetro motilidade total, resultados que sugerem uma maior sensibilidade das características de velocidade dos espermatozóides para a estimativa do potencial de fertilidade de amostras de sêmen bovino.

Apesar de diversos trabalhos reportarem a importância dos parâmetros de velocidade espermática para a determinação dos índices de fertilidade *in vitro* e *in vivo*, pode-se afirmar que os meios diluidores e concentração de espermatozóides processados não exerceram influência sobre a velocidade dos espermatozóides quando considerados apenas os parâmetros VAP e VSL, de acordo com a metodologia proposta para o experimento. Os valores similares em termos de velocidade espermática justificam a não observação de diferenças estatísticas para a porcentagem de espermatozóides exibindo movimento rápido (Rap, %) em função do meio de criopreservação ou da concentração espermática por palheta francesa.

Em relação às amostras processadas na concentração de 100 milhões de espermatozóides totais por mL não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes meios diluidores utilizados para nenhuma das variáveis de velocidade espermática mensuradas no experimento. A principal justificativa para os achados reside no próprio efeito da concentração espermática das amostras, influenciando negativamente o padrão de movimento desempenhado pelas células.

Para amostras altamente concentradas pode-se observar a exclusão de análise das células espermáticas mais rápidas em função das próprias colisões que ocorrem entre os espermatozóides ou pela grande proximidade existente entre as células (VERSTEGEN et al., 2002). Em virtude de um maior número de colisões e sobreposições celulares durante o movimento, também se torna plausível a suposição de que a concentração espermática por palheta exerça influência sobre os índices de retilinearidade e linearidade das amostras analisadas através de CASA. Nesse sentido, a TABELA-5

ilustra as diferenças estatísticas encontradas para STR e LIN em função da concentração de espermatozóides congelados em meio MKA, identificando, portanto, a interferência significativa do número de células espermáticas criopreservadas sobre a avaliação computadorizada do movimento espermático.

Em contrapartida não foram evidenciadas as mesmas diferenças significativas quando avaliada a influência da concentração sobre os padrões de movimento desempenhados por células espermáticas processadas em diluente TRIS. A hipótese mais provável para explicação dos achados baseia-se nas diferenças cinéticas proporcionadas por cada meio diluidor utilizado no experimento.

Os resultados apresentados nas TABELAS 1, 2, 3 e 4 indicam que os espermatozóides criopreservados em diluidor TRIS apresentam menor proporção de retilinearidade e linearidade pós-descongelação em relação às células processadas em diluente MKA, independentemente da concentração espermática. Nesse sentido presume-se que para amostras naturalmente menos lineares e, portanto, mais circulares, uma menor interferência sobre os padrões de movimento retilíneo pode ser observada, justificando os achados conflitantes apresentados pelos diluidores.

De acordo com os resultados reportados por Ferreira (2000) e Sidhu et al., (1998) a avaliação computadorizada de amostras seminais no aparelho Hamilton Thorn Research apresenta melhor eficiência para concentrações espermáticas entre 20 a 80 x 10⁶ espermatozóides/mL, justificando, portanto, um dos prováveis fatores causais para os resultados alcançados no experimento.

A análise das TABELAS 1 a 4 revela diferenças significativas ($p < 0,05$) para a amplitude lateral de cabeça espermática, frequência de batimentos flagelares, retilinearidade e linearidade de movimento gerados pela técnica CASA, observando-se o claro efeito do meio diluidor na determinação dos resultados, independentemente da concentração de espermatozóides processados por palheta (TABELAS 5, 6 e 7).

Os maiores valores para BCF, STR e LIN apresentados pelos espermatozóides criopreservados com o diluidor MKA indicam uma maior linearidade de movimento em relação às células processadas em diluidor TRIS. Conclusões similares foram apresentadas por Verberckmoes et al., (2005) que compararam a eficiência de 3 meios para manutenção de sêmen bovino a fresco, indicando que os valores aumentados de VSL, BCF, STR e LIN proporcionados pelo diluidor CEP-2 (composição bioquímica sintética do plasma da cauda do epidídimo bovino) estariam relacionados a um maior vigor e retilinearidade dos espermatozóides.

Dentre os diversos parâmetros gerados pela técnica CASA, a linearidade espermática representa a variável de maior correlação com o potencial de fertilização do sêmen bovino congelado (JANUSKAUSKAS et al., 2001; MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, 2005). Hallap et al., (2004) apontam uma correlação significativamente negativa entre a porcentagem de espermatozóides móveis não lineares e às taxas de não retorno ao cio pós-IA.

Januskauskas et al., (2001) observaram uma correlação significativa ($r = 0,82$) entre a linearidade espermática e motilidade total pós-descongelação. Em nosso trabalho foi observado um padrão significativamente maior para a linearidade espermática desempenhada pelos espermatozóides criopreservados em diluidor MKA em relação ao TRIS, resultado que pode explicar em virtude da associação anteriormente citada a superioridade numérica, porém não significativa, dos índices de motilidade total proporcionados pelo diluidor MKA.

Os valores significativamente superiores para a amplitude lateral de cabeça apresentados pelos espermatozóides criopreservados em diluidor TRIS em relação ao processamento em extensor MKA, independentemente da concentração espermática (MKA 12 = $4,62 \pm 1,38$ vs TRIS 12 = $6,73 \pm 1,52$; MKA 25 = $4,63 \pm 1,03$ vs TRIS 25 = $6,29 \pm 1,32$; MKA 50 = $4,93 \pm 1,04$ vs TRIS 50 = $6,31 \pm 1,13$; MKA 100 = $5,34 \pm 1,10$ vs TRIS 100 = $6,15 \pm 0,61$) permitem a especulação de um maior grau de hiperativação dos espermatozóides congelados em meio Tris-gema de ovo frutose.

Fisiologicamente o processo de hiperativação corresponde ao padrão de movimento vigoroso, não progressivo e não linear desempenhado pelos espermatozóides mamíferos, especialmente modulado para o transporte espermático através da região tubárica do aparelho reprodutor feminino apresentando relação com os fenômenos de capacitação e fertilização ovocitária (DELL`AQUA Jr. et al., 2006; VERSTEGEN et al., 2002).

Os espermatozóides bovinos hiperativados exibem movimentação extremamente lateralizada compondo um padrão classificado como em “forma de estrela” ou “forma de 8” (MARQUEZ & SUAREZ, 2004; TARDIFF et al., 1997), apresentações cinéticas que podem ser objetivamente avaliadas através da análise computadorizada do movimento espermático (KAVAC et al., 2003).

Segundo Verstegen et al. (2002), altos índices de VCL e ALH associados a baixos valores de LIN correspondem às características de movimento geradas pela técnica CASA freqüentemente utilizadas para definir o estado de hiperativação espermática de uma amostra seminal.

Geralmente a hiperativação é considerada como componente do processo de capacitação, pois se observa que os espermatozóides tornam-se hiperativos enquanto a capacitação se processa *in vitro* (MARQUEZ & SUAREZ, 2004). Robertson et al., (1998) indicam que a investigação da relação temporal entre mudanças nos padrões de motilidade espermática e a ocorrência do “destacamento” espontâneo do acrossomo sugerem uma associação entre esses eventos.

Embora estabelecido o papel fisiológico do movimento hiperativo, pouco se conhece sobre os mecanismos pelo qual ele é iniciado (MARQUEZ & SUAREZ, 2004). Acredita-se que enquanto a capacitação espermática é ativada pela presença de glicosaminoglicanos e regulada pela produção de AMP_C celular, a hiperativação relaciona-se a biodisponibilidade de íons cálcio (HALLAP et al., 2005; JANUSKAUSKAS et al., 2000; SUAREZ et al., 1993). Segundo Ho & Suarez (2001) o Ca⁺⁺ desempenha o principal papel na regulação do movimento hiperativo, observando-se uma maior concentração citoplasmática do íon em espermatozóides hiperativados.

A despeito da importância fisiológica do processo de hiperativação, relacionando-se ao transporte de gametas e a penetração do ovócito (HAFEZ & HAFEZ, 2004; HO & SUAREZ, 2001) este padrão de movimento, baseando-se nas afirmações de Centola et al., (1998) e Hallap et al., (2004) pode representar o indicativo de um maior grau de crioinjúria para as amostras congeladas com o diluidor TRIS, e, portanto, prejuízos ao processo de fertilização. Embora a capacitação e reação do acrossomo sejam vitais para a fecundação, os eventos só apresentam benefícios para espermatozóides que se encontram na proximidade do ovócito, podendo ocasionar a morte celular prematura para amostras utilizadas na IA (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2006).

Bilodeau et al., (2002) indicam que o diluidor Tris-gema de ovo apresenta uma baixa capacidade de neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante o processo de criopreservação, permitindo, portanto, a formação de substâncias primariamente responsáveis pela peroxidação dos lipídeos de membrana responsáveis pelo controle da permeabilidade celular.

Alterações nas membranas espermáticas levam ao aumento da permeabilidade a íons como o Ca^{++} e HCO_3^- que penetram no citoplasma celular estimulando a enzima adenilciclase à produção de AMP_C que leva a estimulação da proteína quinase A, e que por sua vez atua na fosforilação da proteína tirosina, evento que culmina com a capacitação espermática (MARQUEZ & SUAREZ, 2004). Nesse sentido, presume-se uma maior predisposição das células espermáticas criopreservadas em diluidor TRIS ao influxo de íons cálcio, justificando a maior proporção de espermatozóides hiperativados em relação ao diluidor MKA.

Resultados similares ao nosso experimento foram reportados por Tardiff et al., (1997), observando uma maior proporção de hiperativação espermática proporcionada pelo meio TRIS em relação ao diluidor Cornell University. Segundo os mesmos autores, o movimento hiperativo pode estar relacionado a resposta das células espermáticas a interação iônica com as moléculas presentes no TRIS.

Em relação ao teste de resistência espermática pós-TTR foi observada resposta similar entre os dois grupos estudados ($p=0,9858$). Apesar da consagrada utilização das provas de termorresistência na rotina da avaliação laboratorial do sêmen congelado de diversas espécies de interesse econômico, tem-se atribuído uma baixa correlação dos resultados obtidos ao TTR com os índices de fertilidade animal.

Viana (2004) não observou correlação entre a porcentagem de espermatozóides móveis pós-teste de termorresistência rápido e lento com os índices de concepção pós-inseminação artificial em bovinos. Tais achados podem estar relacionados a própria metodologia empregada na realização do TTR, submetendo as amostras seminais a condições “anti-fisiológicas”, representadas pelo estresse térmico (46°C) e osmótico (osmolaridade acima de 1000mOsm/L determinada pelo uso do crioprotetor glicerol) não representativos das reais condições encontradas pelas células espermáticas no trato reprodutor feminino. Portanto, os resultados obtidos no TTR não determinaram contribuição significativa ao presente modelo experimental, em concordância a outros estudos desenvolvidos anteriormente (ARRUDA et al., 1992; SILVA et al., 2005; VIANA, 2004).

A integridade funcional da membrana plasmática frequentemente representa um sinônimo para viabilidade dos espermatozóides ao processo de fertilização (GIL et al., 2000; GRAHAM & MOCÉ, 2005; RASUL et al., 2001). No entanto os diversos domínios de membrana dos espermatozóides mostram-se altamente vulneráveis a criopreservação, observando-se frequentemente a queda significativa da viabilidade espermática em função do processamento.

A classificação comumente utilizada que agrupa os diferentes touros em “bons” ou “maus congeladores” se relaciona a características individuais da estrutura das membranas espermáticas, as quais podem ser determinadas por fatores genéticos, predispondo a resistência ao processo de criopreservação (STORNELLI et al., 2005).

Em nosso experimento utilizando a combinação de sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína, éster de fluoresceína permeável às membranas espermáticas que atua através da reação com esterases citoplasmáticas (GARNER et al., 1988; MALMGREN, 1997) e o Iodeto de Propídeo, sonda naturalmente impermeável às membranas celulares que se liga ao DNA de espermatozóides previamente lesionados (HARRISON & VICKERS, 1990) não foram observadas diferenças estatísticas entre os espermatozóides criopreservados em meio MKA ou TRIS, independente da concentração espermática.

Os valores médios obtidos para cada meio de criopreservação, independente da concentração de espermatozóides processados foi de $30,84 \pm 8,65$ e $30,95 \pm 9,63$, respectivamente para as células espermáticas criopreservadas em diluidor MKA ou TRIS (TABELA-7), resultados que se assemelham numericamente aos reportados por estudos anteriores (ALBERTI et al., 2005^a; BRITO et al., 2003; CRESPILO et al., 2006^b; CRESPILO et al., 2006^c).

Contraditoriamente Alberti et al., (2005)^b observaram diferença significativa para a IMP proporcionada pelo diluidor Botu-Bov® (predecessor do meio MKA) em relação aos ejaculados bovinos congelados em meio TRIS (30,12% vs 25,90%). Resultados similares também foram reportados por Celeghini et al., (2005) que observaram uma maior preservação de membrana citoplasmática para amostras espermáticas criopreservadas em Botu-Bov® em relação às processadas em diluente Bioxcell® ($28,11 \pm 1,11$ vs $18,16 \pm 0,97$ %, respectivamente).

A manutenção de IMP do sêmen bovino após o processo de congelação/descongelação parece sofrer grande influência dos componentes presentes no meio diluidor. Garner et al., (1988) utilizando a associação fluorescente CFDA+PI e análise por citometria de fluxo observaram uma população significativamente maior de espermatozóides íntegros ($p < 0,0001$) para amostras de sêmen bovino congeladas em meio citrato-gema de ovo em relação ao diluidor a base de leite homogeneizado.

Resultados similares foram apontados por Thun et al., (2002) que observaram uma maior proporção de IMP para espermatozóides criopreservados em meio a base de gema de ovo em relação aos processados em diluidor Biociphos-plus®, composto por lecitina de soja. Nesse sentido, Medeiros et al., (2002) destacam o papel das lipoproteínas e fosfolipídeos presentes na gema de ovo como responsáveis pelo mecanismo de proteção das membranas espermáticas, aumentando a proporção colesterol/fosfolipídeos dos espermatozóides e com isso reduzindo-se a ocorrência do choque térmico ou choque frio.

Como em nosso trabalho ambos os meios de congelação utilizados apresentavam 20% de gema de ovo como fonte de lipoproteínas, justificam-se os resultados similares em termos de preservação das membranas espermáticas. Possivelmente através de um maior número de análises laboratoriais e a associação de técnicas mais sensíveis como a citometria de fluxo que apresenta autonomia para avaliação de 10.000 a 50.000 espermatozóides por minuto (ARRUDA et al., 2004; GRAHAM & MOCÉ, 2005), as prováveis diferenças existentes entre os diferentes meios diluidores de criopreservação quanto a manutenção da IMP e viabilidade espermática pós-descongelação poderiam ser identificadas.

Experimentos prévios têm estabelecido que os procedimentos de separação espermática conduzidos pré ou pós-criopreservação resultam na seleção de espermatozóides bovinos de maior qualidade e fertilidade (CENTOLA et al., 1998; CORREA & ZAVOS, 1996; SAMARDZIJA et al., 2006). Nesse sentido, os resultados obtidos por técnicas como o *swim-up* podem ser utilizados como marcadores para a eficiência do processo de congelação e descongelação, representando quantitativamente e qualitativamente o potencial de fertilidade intrínseco para cada amostra de sêmen bovino congelado.

No Experimento I não foram evidenciadas diferenças significativas para os parâmetros integridade de membrana plasmática pós *swim-up*, taxa de recuperação espermática em função da

dose inicial e taxa de recuperação total entre os meios de criopreservação utilizados ou entre as diferentes concentrações de células espermáticas processadas por palheta.

Frente aos resultados obtidos duas importantes questões podem ser levantadas para melhor compreensão dos dados gerados: (1) - a técnica de separação empregada foi efetiva para a recuperação da população espermática de maior potencial de fertilidade e viabilidade? (2) - a técnica de *swim-up* apresenta sensibilidade suficiente para identificar as possíveis diferenças existentes entre os meios de criopreservação quanto à qualidade dos espermatozóides recuperados (assumindo-se que a qualidade das células recuperadas apresenta relação direta com a efetividade do processo de congelamento)?

Para avaliação da efetividade de seleção da técnica, a TABELAS 8 apresenta os resultados agrupados de acordo com a concentração espermática por amostra seminal (reunião dos dados gerados independente do meio diluidor) para a integridade de membrana plasmática pós-descongelamento (IMPd) e pós *swim-up* (IMPs). Nessa simulação são observadas diferenças significativas para a proporção de IMPd e IMPs para amostras criopreservadas, respectivamente, nas concentrações de 50 ($30,79 \pm 8,69^a$ vs $36,54 \pm 13,67^b$) ou 100 milhões de espermatozóides por mililitro ($28,57 \pm 9,25^a$ vs $35,32 \pm 17,00^b$).

Os dados gerados indicam que a concentração espermática pode exercer influência sobre a qualidade das células recuperadas. Frente aos resultados observados presume-se que para amostras seminais menos concentradas (12 e 25 milhões de células totais/mL) ocorre uma menor interferência competitiva entre os espermatozóides para a migração através dos diferentes gradientes fluidos impostos pela técnica de *swim-up*, favorecendo o deslocamento de células que mesmo apresentando lesões de membrana preservaram a motilidade. Nesse sentido, os espermatozóides encontram-se com maior liberdade para execução do movimento, havendo um menor número de colisões e, portanto,

uma menor interferência da trajetória celular, resultando, portanto, em uma menor efetividade de seleção.

Tais conclusões tornam-se ainda mais prováveis pela observação dos resultados expressos nas TABELAS 5 e 6, que indicam que para os dois meios de congelação utilizados houve a tendência ($p < 0,1$) de maior recuperação espermática (em função da dose inicial) para amostras criopreservadas sob menores concentrações espermáticas, ocorrendo, portanto, uma maior recuperação proporcional para amostras contendo 12 ou 25 milhões de células em relação aos demais grupos experimentais. Essas evidências apóiam a hipótese de uma menor efetividade de seleção para amostras de sêmen bovino congelado processadas sob maiores taxas de diluição.

Na FIGURA 4 é realizada uma nova simulação agrupando todos os dados gerados para IMPd e IMPs independente do meio de criopreservação e da concentração espermática por palheta de 0,5 mL. Nesse caso, não foram evidenciadas diferenças significativas entre as variáveis, sugerindo que a técnica de *swim-up* não foi efetiva na seleção de uma população espermática de maior viabilidade.

Tais achados contrariam os reportados por Parrish & Foote (1987) e Somfai et al., (2002) que demonstraram a efetividade do *swim-up* para a recuperação de sub-populações espermáticas apresentando maior motilidade, velocidade e integridade das membranas plasmáticas e acrossomais.

No entanto torna-se importante destacar que a maior parte dos estudos desenvolvidos anteriormente utilizavam técnicas supra-vitais como a Eosina-Nigrosina (EN) ou Tripán Blue Giensa (TBG) para o acesso à integridade de membrana plasmática do sêmen bovino pós-descongelação e pós *swim-up*.

Apesar da consagrada utilização de tais técnicas para a análise de amostras seminais das mais diversas espécies, os corantes supra-vitais apresentam uma baixa eficiência para a avaliação da viabilidade do sêmen bovino congelado em função do crioprotetor glicerol, constituinte comumente

utilizado para congelação espermática, que exerce importante influência sobre a marcação tintorial dos espermatozóides (GARNER et al., 1988; MIXNER & SAROFF, 1954).

Nesse sentido, a eliminação dos agentes crioprotetores durante a realização das provas de *swim-up* (“efeito lavagem” sobre as amostras seminais) pode determinar um acréscimo substancial na efetividade das técnicas supra-vitais, tornando incomparável o índice de integridade de membrana pós-descongelação (interferência do glicerol) e pós-separação (sem glicerol), levando a superestimativa das diferenças para a IMP. Corroborando com as hipóteses levantadas, Brito et al., (2003) indicam que as colorações de EN e TBG superestimam a proporção de espermatozóides íntegros de uma amostra em relação aos corantes fluorescentes CFDA e PI.

Outro fator que pode estar envolvido nos resultados similares observados para a IMP pós-descongelação ou *swim-up* corresponde ao estimulante cafeína presente no diluidor mDM utilizado nas provas de separação (APÊNDICE 4). Segundo Márquez & Suarez (2004) a hiperativação espermática pode ser induzida em espermatozóides não capacitados através de agentes como a cafeína e procaína.

Pereira et al., (2000) apontam que a cafeína pode estimular a ocorrência de reação acrossomal para espermatozóides bovinos e caprinos em função do tempo de incubação com o agente. Nesse sentido, como a metodologia de *swim-up* utilizada em nosso trabalho previa a incubação das amostras por 45 minutos, pode-se inferir um aumento da proporção de células capacitadas ao final das avaliações, e conseqüentemente, uma maior marcação espermática pela sonda iodeto de propídeo.

Como os procedimentos de incubação ou diluição espermática pós-descongelação aumentam a velocidade de capacitação dos espermatozóides (PÉREZ et al., 1996) e a cafeína presente no meio de separação exerce estímulo direto sobre o processo, uma maior quantidade de células podem ser identificadas como portadoras de membrana plasmática lesada por exibirem marcação pela sonda

Iodeto de Propídeo na região acrossomal, levando a diminuição da sensibilidade da técnica de *swim-up* para a avaliação do potencial de fertilidade de amostras de sêmen bovino congelado.

6.2 – No Experimento II foram avaliadas as possíveis interações entre o diluente de congelação e a dose inseminante na determinação dos índices de concepção de vacas Nelore ou ½ Sangue Nelore inseminadas em tempo-fixo.

Nas últimas décadas, questões como o número mínimo de espermatozóides necessários para a obtenção de índices aceitáveis de concepção e a relação entre os diferentes testes conduzidos laboratorialmente e os índices de fertilidade vêm motivando diversos trabalhos de pesquisa envolvendo a IA em bovinos.

Um dos maiores entraves para a determinação da melhor dose inseminante, apresentando a melhor relação custo/benefício e garantindo bons índices de fertilidade, representa a grande variação individual dos touros. Diversos trabalhos reportam a variabilidade marcante entre os índices de fertilidade tomados individualmente (“efeito touro”), observando-se diferenças significativas entre animais quanto às taxas de concepções relacionadas ao número de espermatozóides inseminados (ANDERSON et al., 2004; DEEN DAAS, et al., 1998; JONDET, 1972; NEHRING & ROTHE, 2003), taxa de fertilização e número de embriões recuperados pós-transferência de embriões (MISRA et al., 1999; SAACKE et al., 2000), taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário inicial em sistemas de fertilização *in vitro* (WARD et al., 2001) e manutenção da gestação pós-inseminação artificial (LIMA et al., 2004).

Nesse sentido, trabalhos utilizando a mistura de amostras seminais de diferentes touros (“pool de sêmen”) apresentam grande contribuição para a exclusão de possíveis efeitos individuais relacionados ao reprodutor, permitindo não apenas a observação dos índices médios de concepção

determinados individualmente, mas a identificação de possíveis tendências a serem aplicadas na dinâmica das diferentes populações animais.

Para determinação das possíveis interações entre o aumento da dose inseminante, diluente de criopreservação e taxas de concepção de vacas inseminadas em tempo-fixo foi utilizado um “pool de sêmen” composto por 7 ejaculados de diferentes touros selecionados no primeiro experimento.

Seguindo as mesmas tendências observadas no Experimento I, foram encontradas diferenças numéricas pronunciadas para as variáveis BCF, LIN, STR (sempre superiores para amostras processadas em diluidor MKA, independente da concentração de espermatozóides por palheta), ALH e VCL (sempre maiores para espermatozóides criopreservados em diluidor Tris-gema de ovo frutose) em função dos meios diluidores empregados na criopreservação. No entanto como apenas um único “pool de sêmen” foi utilizado para a concretização de todas as etapas do Experimento II, não houve grande variabilidade entre as amostras avaliadas laboratorialmente para composição das médias a serem comparadas entre os diferentes grupos.

Sendo assim, diferenças estatísticas observadas no Experimento I não se repetiram de forma homogênea entre os diferentes diluentes e concentrações espermáticas no Experimento II, resultados relacionados ao baixo número de repetições (“pool” analisado em quadruplicata) e a baixa variabilidade entre as amostras.

As diferenças estatísticas mais pronunciadas foram observadas para as amostras seminais criopreservadas nas concentrações de 12×10^6 ou 50×10^6 espermatozóides/mL em relação aos demais grupos estudados, observando-se maiores índices de retilinearidade e linearidade, associados a menor amplitude lateral de cabeça para células espermáticas congeladas em MKA. Diferenças significativas foram evidenciadas entre as taxas de recuperação espermática pós *swim up* (total e relativa) em função do meio de criopreservação utilizado para o processamento do “pool de sêmen” na concentração de 12 milhões de células por mililitro.

Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas para maior parte dos parâmetros de movimento espermático avaliados, observa-se uma tendência de maior qualidade cinética para o “pool de sêmen” bovino congelado em meio MKA em relação ao TRIS, resultados que podem determinar maiores taxas de concepção na IA. Nesse sentido, Farrel et al., (1998) reportam correlações para a associação de ALH + BCF + MP; BCF + VCL + MP; e BCF + LIN + VSL + VCL + STR, respectivamente, de 0,83, 0,82 e 0,97 com os índices de fertilidade expressos pela taxa de não retorno ao cio pós-IA, demonstrando a validade e veracidade dos parâmetros gerados por CASA para a avaliação do potencial de fertilização de amostras de sêmen bovino congelado.

Correlações positivas são observadas entre os padrões de motilidade pós-descongelção, longevidade espermática e fertilidade animal (DHAMI et al., 1996), sendo que a porcentagem de espermatozóides móveis quando avaliada objetivamente representa o parâmetro isolado de maior coeficiente de correlação com a fertilidade de touros, segundo trabalhos de Correa et al., (1997).

Martinez-Rodríguez (2006) destaca que a maioria dos espermatozóides contidos em uma amostra de sêmen bovino deve apresentar movimento tipicamente progressivo e linear, características relacionadas a capacidade de migração através do sistema reprodutor feminino, e portanto, vinculadas ao potencial de fertilidade espermática. Muzaffer et al., (2006) avaliando às características de movimento espermático através da taxa de migração em muco cervical, observaram que as partidas de sêmen que apresentaram maior penetração no muco atingiram maiores índices de concepção na IA, resultados que denotam a importância das características cinéticas dos espermatozóides para obtenção de maior eficiência reprodutiva.

Outro resultado que merece atenção representa a IMP pós-descongelção para amostras criopreservadas na concentração de 25×10^6 espermatozóides totais/mL. O “pool” de sêmen congelado em diluente TRIS apresentou cerca de 13% a mais de preservação das membranas

espermáticas em relação às amostras criopreservadas em MKA, representando a primeira ocorrência reportada no experimento para diferenças na IMP pós-descongelação entre os dois meios diluidores.

A origem de tais diferenças não foi elucidada, estando provavelmente relacionada a falhas no processamento de algumas amostras criopreservadas em meio MKA (erros na homogeneização do “pool” pré-congelação, palhetas mal lacradas, entre outras), visto que não foram observadas diferenças significativas nos índices de concepção proporcionados por amostras criopreservadas na concentração de 25×10^6 células totais/mL em função dos meios diluidores de congelamento.

Novamente foram observadas taxas de recuperação espermática pós *swim-up* relativamente maiores para partidas contendo 12 milhões de espermatozóides em relação às amostras mais concentradas (grupos MKA), corroborando para a confirmação do efeito da concentração espermática sobre a eficiência de seleção da prova de *swim-up*.

Frente ao conjunto de resultados laboratoriais apresentados pelo “pool de sêmen” bovino atribui-se uma maior expectativa em termos de fertilidade para as amostras criopreservadas em diluidor MKA em relação ao Tris-gema de ovo frutose, embora não tenham sido realizadas as devidas análises de correlação entre os parâmetros espermáticos avaliados *in vitro* e as taxas de concepção observadas para vacas submetidas a IATF no presente experimento.

Para obtenção de uma melhor performance reprodutiva, traduzida por um intervalo entre partos de 12 meses ou intervalo parto-concepção de 85 dias, protocolos hormonais se fazem necessários para suplantam os efeitos do anestro pós-parto e da lactação (BELLOSO et al., 2002). Em nosso experimento foi utilizado o protocolo Crestar® associado a gonadotrofina coriônica equina para sincronização do estro e indução das ovulações para a IATF de vacas Nelore ou ½ sangue Nelore apresentando condição corporal média = 2,5 (escala 1 a 5).

Os protocolos hormonais a base de Crestar® consistem em um implante subcutâneo de silicone contendo 3,0 mg de norgestomet e uma solução composta por 3,0 mg de norgestomet e 5,0

mg de valerato de estradiol para administração no momento da inserção do implante (KASTELIC et al., 1999).

Uma importante estratégia para indução sincronizada da ovulação em animais em anestro pós-parto representa a administração de eCG ao término dos protocolos com progestágenos; o eCG atua na estimulação do crescimento folicular e conseqüente produção de estrógenos conduzindo ao pico pré-ovulatório de LH na maioria dos animais tratados (BELLOSO et al., 2002; BARUSELLI et al., 2004).

Em nosso trabalho os resultados finais de concepção para vacas submetidas a IATF, segundo protocolo descrito anteriormente, foram de 49,47% (concepção total) e 57,59 (considerando-se apenas os animais sincronizados e que exibiram ovulação), independente do meio diluidor e da dose inseminante utilizada. Os dados gerados encontram-se em conformidade aos reportados por Bó et al., (2003) que indicam taxas de concepção entre 37 a 54% para vacas sincronizadas com Crestar® e eCG.

O tamanho médio do folículo ovulatório observado ultra-sonograficamente no momento da IATF foi de $11,5 \pm 0,25$ milímetros, valores semelhantes aos reportados por Colaso et al., (2005) que descrevem o diâmetro de $12,5 \pm 2,10$ para novilhas de raças de corte submetidas ao mesmo protocolo. O tamanho do folículo ovulatório apresentou-se numericamente inferior a outros estudos como o de Martin et al., (2004) utilizando vacas Nelore submetidas a sincronização com GnRH e análogos de prostaglandina.

A provável explicação para tais diferenças relaciona-se a administração do valerato de estradiol no momento da inserção do implante. O valerato (VE) e o cipionato de estradiol (CP) na presença de progesterona causam a regressão dos folículos antrais presentes nos ovários; no entanto a meia vida longa desses ésteres de estradiol pela baixa solubilidade em água leva a um atraso e a uma alta dispersão no dia da emergência de uma nova onda folicular (BARUSELLI, 2004). A nova

onda de crescimento ou emergência folicular observada em vacas sincronizadas com progestágenos e VE ocorre entre 1 a 7 dias (média de 4,7 dias) após a administração do estradiol, justificando-se portanto a presença de menores folículos ovulatórios no momento da IATF (COLAZO et al., 2005; DUFFY et al., 2004).

A taxa de ovulação observada no experimento foi de 85,89% (408/475 animais sincronizados), resultados similares aos apresentados Meneguetti et al., (2006) utilizando diferentes doses de eCG, benzoato e cipionato de estradiol (com ou sem remoção temporária de bezerros por 48 horas) como indutores de ovulação. Taxas inferiores (71,00%) foram reportadas por Sá Filho et al., (2004) utilizando o protocolo Crestar® e eCG para vacas Nelore lactantes em anestro; tais diferenças sugerem que o lote de animais utilizados em nosso experimento, em detrimento a baixa condição corporal média (2,5), não se apresentava integralmente em condição de anestro pós-parto, exibindo uma alta resposta em termos de sincronização do estro e ovulação.

Segundo Cavalieri et al., (1997) o intervalo compreendido entre o final do protocolo Crestar®/eCG e o pico de LH e ovulação corresponde, respectivamente, a 36,8 a 53,0 horas (média = 41,6) e 60,8 a 82,5 horas (média = 67,3). Sá Filho et al., (2004) utilizando o mesmo protocolo para vacas Nelore lactantes em anestro observaram o momento médio de ocorrência das ovulações de $70,9 \pm 2,0$ horas após a retirada do implante. Baseando-se nessas informações, como em nosso experimento as IATFs foram realizadas 48 horas após o término do protocolo, pode-se assumir um período mínimo de latência de 20 horas até a ocorrência da interação das células espermáticas com o ovócito da fêmea bovina, situação que provavelmente pode favorecer as metodologias de criopreservação seminal que determinarem uma maior longevidade espermática pós-descongelamento ou um maior número de espermatozoides viáveis.

Em nosso experimento foi observada uma tendência significativa e linear ($p = 0,0132$) para o aumento da concentração de espermatozoides inseminados sobre os índices de concepção de vacas

ovuladas submetidas a sincronização do estro e ovulação para IATF (FIGURA-6; TABELA-16), resultados provavelmente relacionados a um maior número de espermatozóides acessórios presentes no oviduto da fêmea bovina apresentando-se aptos a fertilização.

As possíveis falhas espermáticas em estabelecer contato com o ovócito feminino após a IA representam a origem primária dos fracassos no processo de fecundação (HAWK, 1986). Embora se observe uma baixa quantidade de células espermáticas no sítio de fertilização em relação ao número de espermatozóides inseminados (JANUSKAUSKAS & ZILINSKAS, 2002) são reportadas correlações positivas para o aumento da dose inseminante em função do número de espermatozóides que alcançam o oviduto e o número células espermáticas adicionais (HAWK, 1986; LARSSON & LARSSON, 1986; SAACKE et al., 2000).

O aumento da dose inseminante exerce influência sobre o número de espermatozóides acessórios por ovócito ou embrião bovino, resultando em maiores índices de fertilidade e qualidade embrionária (DEJARNETTE et al., 1992; NADIR et al., 1993). Segundo Dalton (1999), uma das alternativas para o aumento da eficiência da inseminação artificial em ovulações simples ou para vacas superovuladas compreende ao acréscimo de espermatozóides acessórios por meio do aumento da dose inseminante.

Utilizando “pool de sêmen” bovino, Albrecht et al., (2005) observaram que a elevação da dose inseminante de 12×10^6 para 28×10^6 espermatozóides progressivos totais pós-descongelamento determinavam índices de concepção 9% maiores ($p > 0,05$) para vacas inseminadas em tempo-fixado, resultados que sinalizavam, segundo os autores, para a importância do número de espermatozóides inseminados na determinação dos índices de concepção à IATF.

Embora sejam reportados índices de fertilidade considerados normais para amostras seminais a partir de $1,0 \times 10^6$ a 10×10^6 espermatozóides totais (ANDERSSON et al., 2004; DEEN DASS et al.,

1998; FOOTE & KAPROTH, 1997; JONDET, 1972), a maioria dos estudos conduzidos anteriormente baseiam-se na observação das taxas de não retorno ao cio (60 a 90 dias) e na avaliação dos índices de concepção tomados individualmente, geralmente avaliando-se um pequeno número de reprodutores. Como abordado em tópicos anteriores, ocorre uma influência significativa do reprodutor sobre os índices de concepção animal, observando-se que a habilidade para alcançar o ovócito *in vivo* pode diferir em mais de 10 vezes entre diferentes touros quando se utilizam baixas doses inseminantes (DEEN DASS et al., 1998). Tardiff et al., (1997) reportam a ocorrência de possíveis interações entre o reprodutor, meio de criopreservação e tipo de processamento, representando outra fonte de variação a ser considerada para estudos baseados na observação individual dos índices de fertilidade.

Embora consagrada na literatura, a taxa de não retorno ao cio apresenta sérias limitações relativas a eficiência de detecção do estro especialmente para rebanhos compostos por animais *Bos taurus indicus*, genótipo que caracteriza-se por uma curta duração do cio que apresenta ocorrência predominantemente noturna (PINHEIRO et al., 1998). Em virtude da baixa sensibilidade do índice, possíveis comparações de resultados obtidos por diferentes estudos tornam-se mais difíceis.

Como nosso trabalho baseia-se na inseminação heterospérmica e constatação ultrassonográfica da ovulação, pode-se assumir que os resultados obtidos apresentam relação com os índices de fertilidade *in vivo* quando o efeito da dose inseminante é considerado sobre a população bovina, indicando uma tendência que pode nortear a escolha de determinadas amostras seminais (baseando-se na concentração) para a utilização na IATF.

Além do número de espermatozóides inseminados, a qualidade das amostras seminais é determinante para o sucesso dos programas de IA. Pode-se assumir que a inseminação com reduzido número de espermatozóides viáveis resulta em quedas nas taxas de concepção ou na abolição das gestações (JANUSKAUSKAS & ZILINSKAS, 2002), indicando a associação das duas variáveis

espermáticas para obtenção dos melhores índices reprodutivos. Nesse sentido, Sartori et al., (2004) obtiveram menores índices de recuperação embrionária ($p < 0,05$) para vacas inseminadas com 20×10^6 ou 10×10^6 de espermatozóides sexados totais (uma ou duas inseminações, respectivamente) em relação a dose inseminante de 10×10^6 células espermáticas não sexadas, demonstrando que o comprometimento da qualidade dos espermatozóides relacionado ao procedimento de separação pode comprometer os índices de fertilidade animal.

Garcia et al., (1999) observaram que a utilização de sêmen bovino refrigerado por 8 horas resultou em aumento dos índices de concepção de novilhas submetidas a sincronização do estro para IATF ($p < 0,05$), resultados atribuídos a maior viabilidade e qualidade do sêmen bovino em comparação às amostras seminais refrigeradas por 32 horas ou congeladas.

As variações nos índices de concepção relacionadas a utilização de diferentes amostras seminais para a IA podem ser justificadas pelas mudanças no funcionamento das células espermáticas que ocorrem no trato reprodutor feminino, envolvendo alterações nos padrões de movimento ou eventos moleculares associados à capacitação, interação com o ovócito e reação acrossomal (SAACKE et al., 2000). Para que todos esses processos possam ocorrer, torna-se imperativo que as metodologias utilizadas na criopreservação dos espermatozóides bovinos promovam a conservação da integridade físico-química das células espermáticas pós-descongelamento.

Nesse sentido, foram observadas diferenças significativas para a interação concentração de espermatozóides inseminados em função do diluente TRIS ($p = 0,0126$). Em contrapartida índices similares de concepção foram observados para amostras seminais congeladas em diluidor MKA ($p = 0,6781$), não sendo observada melhora significativa para os índices reprodutivos em função do aumento da dose inseminante (FIGURA-5).

Como os padrões de movimento refletem o ambiente bioquímico e as condições físicas impostas aos espermatozóides, os resultados inferiores de congelabilidade para amostras criopreservadas em diluente TRIS (Experimentos I e II) provavelmente determinaram a necessidade do aumento da dose inseminante para a obtenção de melhores índices de concepção.

Como diversos trabalhos têm demonstrado a influência dos meios diluidores e seus constituintes específicos sobre os padrões de movimento do sêmen bovino pós-descongelção (HIRAI, et al., 1997; GIL et al., 2001; MOUSSA et al., 2002) e sobre os índices de fertilidade observados *in vitro* e *in vivo* (KOMMISRUUD, et al., 1996; THUN et al., 2002; AMIRAT et al., 2005) conclui-se que amostras seminais criopreservadas em diluidor MKA tendem a apresentar índices de fertilidade lineares independente da dose inseminante; já para partidas de sêmen criopreservadas em diluidor Tris-gema de ovo frutose observa-se o efeito significativo do aumento da concentração de espermatozóides inseminados em função dos índices de concepção na IATF, sugerindo um efeito compensatório da dose inseminante frente aos índices inferiores de congelabilidade espermática determinados laboratorialmente.

Embora não comprovado estatisticamente ($0,05 < p < 0,10$), os dados gerados no trabalho sugerem que o meio de congelção pode exercer influência sobre os índices médios de concepção de vacas inseminadas em tempo-fixo, podendo-se assumir que as amostras seminais criopreservadas em diluidor MKA tendem a apresentar melhores índices de fertilidade em relação às partidas processadas em meio TRIS, segundo a metodologia utilizada em nossa pesquisa.

7.0 – CONCLUSÕES

7.1 – Os diluentes de criopreservação de sêmen bovino exercem influência significativa sobre os parâmetros de congelabilidade espermática avaliados laboratorialmente.

7.2 – Os índices de congelabilidade seminal são influenciados pelo número de espermatozóides processados por palheta de 0,5 mL.

7.3 – O diluidor de congelação pode influenciar os resultados de concepção de vacas inseminadas, a despeito da não comprovação estatística para tal efeito. O meio MKA é em média mais efetivo em relação ao diluidor TRIS na determinação de melhores índices de fertilidade na IATF.

7.4 – A dose inseminante exerce influência significativa nos índices de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo-fixo utilizando o protocolo hormonal a base de norgestomet e gonadotrofina coriônica eqüina, demonstrando que o aumento do número de espermatozóides inseminados pode determinar a melhora da eficiência reprodutiva dos programas de IATF.

8.0 – REFERÊNCIAS

ALBERTI, K. et al. Eficiência de novo diluente na congelabilidade de sêmen bovino. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18., 2004, Barra Bonita. **Resumos...**Barra Bonita, 2004. p.176.

ALBERTI, K. et al. Effect of Botu-Bov® and TRIS extenders on semen freezability in bulls *Bos taurus taurus* & *Bos taurus indicus*. In: Reunião REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 19., 2005, Angra dos Reis. **Resumos...** Angra dos Reis, 2005^a. p.326.

ALBERTI, K. et al. Botu-Bov®: a new proposal for an extender in cryopreservation of bovine semen. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 19., 2005, Angra dos Reis. **Resumos...** Angra dos Reis, 2005^b. p.325.

ALBRECHT, A.; CAVIA, R.; LARRABURU, G. Heterospermic insemination at two sperm concentrations in timed AI: CASA semen parameters and pregnancy rates. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 17., 2005, Copenhagen. **Abstracts...**Copenhagen, 2005. p.154.

AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINURIER, D. et al. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Reproduction**, v.129, p.535-543, 2005.

ANDERSSON, M. et al. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. **Theriogenology**, v. 61, p.1583-1588, 2004.

ANZAR, M.; HASSAN, M.M.; GRAHAM, E.F. Efficacy of the Hamilton Thorn Motility Analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. **Theriogenology**, v.36, p.307-317, 1991.

ARRUDA, R.P. et al. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TEFT. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina, 2004. p.166-179.

ARRUDA, R. P. et al. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, n. 1, p. 131-137, 1992.

AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L. **BioEstat 3.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. 3.ed. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá, 2003. 291p.

BARNABÉ, R.C. et al. Correlações entre a motilidade progressiva e retenção do acrossomo em sêmen congelado de bovinos após o descongelamento e após provas de termo resistência. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.18, p.61-8, 1981.

BARNABÉ, V.H. et al. Estudo comparativo entre as provas rápida e lenta de termorresistência para avaliação de sêmen congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.4, n.3-4, p.6-12, 1980.

BARROS, C.M.; ERENO, R.L. Avanços em tratamentos hormonais para a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18., 2004, Barra Bonita. **Anais...** Barra Bonita, 2004. p.23-24.

BARUSELLI, P.S. **Manual prático de inseminação artificial em tempo-fixo**. Curitiba: Idalgraf, 2004. p.4-56.

BARUSELLI, P.S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.479-486, 2004.

BELLOSO, E.S. et al. Improvement of reproductive performance in crossbred zebu anestrus primiparous cows by treatment with norgestomet implants or 96 h calf removal. **Theriogenology**, v. 57, p.1503-1510, 2002.

BILODEAU, J.F. et al. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v. 57, n.3, p. 1105-1122, 2002.

BRITO, L.F.C. et al. 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.

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

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

BRIDGES, P.J. et al. Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-time insemination in beef cows treated with intravaginal progesterone inserts and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 52, p. 573-83, 1999.

CAVALIERI, J. et al. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 47, p. 801-814, 1997.

CELEGHINI, E.C.C. et al. Effects of cryopreservation and diluent on bovine semen with regard to plasmatic and acrossomal membranes and mitochondrial function. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 19., 2005, Angra dos Reis. **Resumos...** Angra dos Reis, 2005. p.327.

CENTOLA, G.M.; HERKO, R.; ANDOLINA, E. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. **Fertility and Sterility**, v.70, n.6, p.1173-1175, 1998.

CHAVEIRO, A. et al. Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmotic Supports. **Theriogenology**, v.65, p.1875-1890, 2006.

CHAVEIRO, A. et al. Determination of bull sperm membrane permeability to water and cryoprotectants using a concentration-dependent self-quenching fluorophore. **Cryobiology**, v.48, p.72-80, 2004.

CHEN, Y. et al. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-Tris and whole milk extenders. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.4, p.1028-1034, 1993.

COELHO, L.A. et al. Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.2, p.397-402, 2000.

COLAZO, M.G. et al. Effect of estradiol valerate on ovarian follicle dynamics and superovulatory response in progestin-treated cattle. **Theriogenology**, v.63, p.1454-1468, 2005.

COOTER, P.Z.; GOOLSBY, H.A.; PRIEN, S.D. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, n.2, p.98-99, 2005.

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; 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.721-723, 1997.

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. Preparation and recovery of frozen-thawed spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. **Theriogenology**, v. 46, p.1225-1232, 1996.

CRESPILHO, A.M.; LANDIM-ALVERENGA, F.C.; PAPA, F.O. Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. **Ciência Rural**, v.36, n.5, p.1507-1510, 2006.

CRESPILHO, A.M. et al. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. **Revista ARS Veterinária**, 2006^b. (No prelo).

CRESPILHO, A.M. et al. Eficiência de dois diluidores para a congelação de sêmen bovino processado em baixas concentrações espermáticas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 20., 2006, Araxá. **Resumos...Araxá**, 2006^c. p.310.

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

CURTIS, G.G. et al. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **Journal of Andrology**, v.19, n.6, p.704-709, 1998.

DALTON, J.C. Factors important to the efficiency of artificial insemination in single-ovulating and superovulated cattle. 1999. 136f. Tese (Doutorado, Área de Concentração: Physiology in Animal Science). Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg/USA.

DAY, M.L. Hormonal induction of estrous cycles in anestrous *Bos taurus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 82-3, p.487-94, 2004.

DEN DAAS, J.H.G. et al. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. **Journal Dairy Science**, v.87, p.1714-1723, 1998.

DEJARNETTE, J.M. et al. Attenuation of premature estrous behavior in postpartum beef cows synchronized to estrus using GnRH and PGF2 α . **Theriogenology**, v. 56, p. 493-501, 2001.

DEJARNETTE, J.M. et al. Accessory sperm: Their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. **Journal of Animal Science**, v.70, p.484-491, 1992.

DELL' AQUA JR., J.A. et al. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. **Acta Científica Veterinária**, v.34, supl.1, p.205-212, 2006.

DELL' AQUA JR., J.A. **Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição do sêmen e concentração da dose inseminante de sêmen congelado equino.** 2000. 81f. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DHAMI, A.J. et al. Effects of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. **Theriogenology**, v.46, p.109-120, 1996.

DIMITROPOULOS, E. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondante du sperme congelé. **Animal Médecine Veterinarian**, v.4, p. 215-224, 1967.

DORIA FILHO, U. Testes estatísticos não paramétricos para dados ordinais. In: DORIA FILHO, U. **Introdução à bioestatística para simples mortais.** 2.ed. São Paulo: Negócio, 1999. p.99-104.

DUFFY, P. et al. The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. **Theriogenology**, v.61, p.725-734, 2004.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13, 1986.

FARRANT, J.; MORRIS, G.J. Thermal Shock and dilution shock as the causes of freezing injuries. **Cryobiology**, v.10, p.134-140, 1973.

FARRELL, P.B. et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-Assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v.49, n.4, p.871-879, 1998.

FAWCETT, D.W. A comparative view of sperm ultrastructure. **Biology of Reproduction**, v.2, p.90-127, 1970.

FERNANDES, P. et al. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF₂ALPHA and estradiol benzoate (EB). **Theriogenology**, v.55, p.1521-1532, 2001.

FERREIRA, J.C.P. **Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelamento do sêmen equino**. 2000. 93p. Tese (Doutorado, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FOOTE, R.H. Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: past, present and future. **Journal of Andrology**, v.3, p.85-100, 1982.

FOOTE, R.H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. **American Society of Animal Science**, p.1-10, 2002b.

FOOTE, R.H.; KAPROTH, M.T. Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.2, p.453-456, 2002.

FUERST-WALTL, B. et al. Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Australian Simmental bulls. **Animal Reproduction Science**, v.95, p.27-37, 2006.

GALINA, C.S.; ORIHUELA, A.; RUBIO, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p.465-470, 1996.

GARCIA, A.R. et al. Influência do uso de sêmen resfriado e da aplicação de GnRH sobre a taxa de prenhez de novilhas Nelore inseminadas em tempo-fixo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.342-344, 1999.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; ALLEN, C.H. Effect of semen dilution on bovine sperm viability as determined by dual-DNA staining and flow cytometry. **Journal of Andrology**, v.18, n.3, p.324-331, 1997.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A.; ALLEN, C.H. Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. **Theriogenology**, v.30, p.369-378, 1988.

GARNER, D.L. et al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v.34, p.127-138, 1986.

GÉRARD, O.; HUMBLLOT, P. Influence of interactions between semen extender and number of spermatozoa on nonreturn rate estimates of fertility for individual Holstein bulls. **Theriogenology**, v.36, p.727-736, 1991.

GIL, J. et al. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biciphos-Plus® and Triladyl®. **Reproduction in Domestic Animals**, v.35, n.2, p.69-77, 2000.

GONZALEZ, R.A.F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino**. 2004. 94f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

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

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality. **AAEP Proceedings**, v.47, p.302-305, 2001.

GRAVANCE, C.G. et al. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **Journal of Andrology**, v.19, n.6, p.704-709, 1998.

GRIFFIN, E.M. **Development of an extender protocol to enhance the viability of frozen-thawed bovine spermatozoa.** 2004. 212f. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Texas A&M University, Houston.

GUTHRIE, H.D.; LIU, J.; CRITSER, J.K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 67, p.1811-1816, 2002.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Transporte e sobrevivência de gametas. In_____. **Reprodução Animal.** 7.ed. Barueri: Manole, 2004. p.83-96.

HALLAP, T. **Assessment of sperm attributes of frozen-thawed AI doses from Swedish and Estonian dairy bulls sires.** 2005. 35f. Tese (Doutorado, Área de Concentração: Animal Reproduction) – Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

HALLAP, T. et al. Does cleasing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, v.62, p.702-713, 2004.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, n.1, p.73-88, 1990.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, n.1, p.343-352, 1990.

HAWK, H.W. Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.1487-1503, 1986.

HIRAI, M.; CERBITO, W.A.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B. The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.47, p. 1463-1478, 1997.

HO, H.C.; SUAREZ, S.S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v.122, p.519-526, 2001.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.1/3, p.2-22, 2000.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.43, p.47-58, 2000.

HURST, V. Dilution of bull semen with frozen egg yolk-sodium citrate. **Journal Dairy Science**, v.36, p. 181-184, 1953.

HWANG, W.S. et al. Studies on the use of computer aided semen analysis (CASA) technology for fertility prediction in Korean native cattle. **Theriogenology**, v.51, p.345, 1999.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; MARTINEZ-RODRIGUES, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, n.4, p. 743-758, 2003.

JANUSKAUSKAS, A., ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. **Veterinarija ir Zootechnika**, v.39, p.1-8, 2002.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J. SÖDERQUIST, L. et al. Relationship between sperm response to glycosaminoglycans in vitro and non return rates of swedish dairy AI bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, v.35, p.207-212, 2000.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.SÖDERQUIST, L. et al. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, v. 42, p.641-658, 1999.

JONDET, R. Contribution to the assessment of the minimal number of frozen spermatozoa necessary to obtain fertilization in the cow. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 7., 1972, Munich. **Proceedings...** Munich, 1972. p.1443-1448.

KAVAC, A. et al. Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v.76, p.205–216, 2003.

KASIMANICKAM, R.; COLLINS, J.C.; WUENSHELL, J. Effect of timing of prostaglandin administration, controlled internal drug release removal and gonadotropin releasing hormone on pregnancy rate in fixed-time AI protocols in crossbred Angus cows. **Theriogenology**, v.66, p.166-172, 2006.

KASTELIC, J. et al. Synchronization of estrus in beef cattle with norgestomet and estradiol valerate. **Canadian Veterinary Journal**, v.40, p.173-178, 1999.

KOMMISRUUD, E.; GRAFFER, T.; STEINE, T. Comparison of two processing systems for bull semen with regard to post thaw motility and nonreturn rates. **Theriogenology**, v.45, n.8, p.1515-1521, 1996.

KURYKIN, J. et al. Low semen dose intracornual insemination of cows at fixed time after PGF_{2α} treatment or at spontaneous estrus. **Animal Reproduction Science**, v.95, p.116-124, 2006.

LARSSON, B.; LARSSON, K. Sperm localization in the oviducts of artificially inseminated dairy cattle. **Acta Veterinaria Scandinava**, v.27, p.3003-312, 1986.

LIMA, F.S.; VASCONCELOS, J.L.M.; GARCIA, P.H. Efeito do touro na taxa de perda de gestação em vacas holandesas lactantes. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18., 2004, Barra Bonita. **Resumos...** Barra Bonita, 2004. p.171.

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

MADUREIRA, E.H. Controle farmacológico do ciclo estral com emprego de progesterona e progestágenos em bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 1., 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2000. p.90-8.

MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen: a review. **Theriogenology**, v.48, p.523-530, 1997.

MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low density lipoprotein fraction of hen`s egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p.1250-1258, 2002.

MANN, T. Studies on the metabolism of semen: fructose as a normal constituent of seminal plasma. Site of formation and function of fructose in semen. **Journal of Biochemistry**, v. 40, p.481-491, 1946.

MARQUEZ, B.; SUAREZ, S.S. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1626-1633, 2004.

MARTIN, I. et al. Características ultra-sonográficas do corpo lúteo e do diâmetro folicular pré-ovulatório de vacas Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18., 2004, Barra Bonita. **Resumos...** Barra Bonita, 2004. p.234.

MARTÍNEZ, C.O. et al. Cryopreservation of Bull spermatozoa alters the perinuclear theca. **Theriogenology**, 2006. (In Press).

MARTINEZ, M.F. et al. The use of GnRH or estradiol to facilitate fixed-time insemination in an MGA-based synchronization regimen in beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p.221-9, 2001.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment? **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, supl.2, p.2-10, 2006.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2005. p.1-8.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.312-18, 2003.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, H. Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches. In: **Topics in bull fertility**. 2000. Disponível em: <www.ivis.org/bull_fertility/2000/Martínez-Rodríguez> Acesso em: 20 ago 2006.

MARTINS JR. et al. Viabilidade *in vitro* de sêmen de touro criopreservado com dois diluentes e reduzida concentração espermática. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 20., 2006, Araxá. **Resumos...** Araxá, 2006. p.311.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological system. **Science**, v.168, p.939-949, 1970.

MEDEIROS, C.M.O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, n.1, p.327-344, 2002.

MENEGHETTI, M.; LOSI, T.C.; VILELA, E.R. Alteração em protocolo de IATF visando a redução de custo e adequação às particularidades de manejo. **A Hora Veterinária**, v.26, n.153, 2006.

MENEGHETTI, M. et al. Effect of different ovulatory induction in synchronization rate. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 19., 2005, Angra dos Reis. **Resumos...** Angra dos Reis, 2005. p.256.

MISRA, A.K. et al. Bull specific effect rate and viable embryo recovery in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.52, p.701-707, 1999.

MIXNER, J.P.; SAROFF, J. Interference by glycerol with differential staining of bull spermatozoa. **Journal of Dairy Science**, v.37, p.652, 1954.

MORAES, J.C.F. Controle da reprodução em bovinos de corte. In: SIMPÓSIO DE REPRODUÇÃO BOVINA, 1., 2002, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2002. p.32-40.

MOREIRA, R.J.C. **Uso do protocolo Crestar® em tratamentos utilizando benzoato de estradiol, PGF_{2α}, PMSG e GnRH para controle do ciclo estral e ovulação em vacas de corte.** 2002. 48p. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MOUSSA, M. et al. Low density lipoproteins: extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed Bull semen. **Theriogenology**, v57, p. 1695-1706, 2002.

MUZAFFER, T. et al. Relationship between bovine fertility and the number of spermatozoa penetrating the cervical mucus within straws. **Animal Reproduction Science**, 2006. (In press).

NADIR, S. et al. Effect of freezing and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility, and embryo quality in artificially inseminated cattle. **Journal of Animal Science**, v.71, p.199-204, 1993.

NAGY, S. et al. Changes in plasma membrane and acrossome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v.80, n.3-4, p.225-235, 2004.

NEHRING, H.; ROTHE, L. Insemination of cryopreserved Bull semen portions with reduced sperm numbers after dilution with two egg yolk-free extenders. In: EUROPEAN A.I. VETS MEETING, 15., 2003, Budapeste. **Anais Palestra...** Budapeste, 2003. p.14-23.

NUNES, J.F. Inseminação artificial em caprinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds). **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p.111-126.

OLDS-CLARKE, P. How does poor motility alter sperm fertilizing ability? **Journal of Andrology**, v.17, n.3, p.183-186, 1996.

PAPA, F.O.; GABALDI, S.H.; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, n.1, p.39-44, 2000.

PARKINSON, T.J. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. **The Veterinary Journal**, v.168, p.215–229, 2004.

PARRISH, J.J.; FOOTE, R.H. Quantification of bovine sperm separation by *swim-up* method – relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. **Journal of Andrology**, v.8, p.259-266, 1987.

PEREIRA, R.J.T.A. et al. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A 23187 on *in vitro* induction of the acrossome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.185-192, 2000.

PÉREZ, L.J. et al. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation *in vitro* as assessed by chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v.46, p.131-140, 1996.

PESH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, 2006. (In press).

PHILLIPS, N.J. et al. Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. **Animal Reproduction Science**, v.81, p. 47–61, 2004.

PINHEIRO, O.L. et al. Estrous behavior and estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂alpha or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-681, 1998.

PRATINI, V.M. Exportações: receita cresce mais de 100% em outubro. In: **Beef Point**, 2006.

Disponível em: <www.beefpoint.com.br/exportação/carne.> Acesso em: 10 nov 2006.

RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.22, n.2, p.278-83, 2001.

ROBERTSON, L.; WOLF, D.P.; TASH, J.S. Temporal changes in motility parameters to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. **Biology of Reproduction**, v.39, p.797-805, 1988.

SAACKE, R.G. et al. Relationship of seminal traits an insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.663-677, 2000.

SÁ FILHO, M.F. et al. Dinâmica folicular de vacas Nelore lactantes em anestro tratadas com progestágeno, eCG e GnRH. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18., 2004, Barra Bonita. **Resumos...** Barra Bonita, 2004. p.235.

SAMARDZIJA, M. et al. A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p.237-247, 2006.

SARTORI, R. et al. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v.1, n.1, p.86-90, 2004.

SAUMANDE, J.; HUMBLLOT, P. The variability in the interval between estrus and ovulation in cattle and its determinants. **Animal Reproduction Science**, v.85, p.171-182, 2005.

SCHENK, J.L.; AMANN, R.P.; ALLEN, C.H. Effects of extender and insemination dose on postthaw quality and fertility of bovine sperm. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.1458-1464, 1987.

SENGER, P.L.; MITCHELL, J.R.; ALMQUIST, J.O. Influence of cooling rates and extender upon post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in .25 and .5 mL French straws. **Journal of Animal Science**, v.56, n.6, p.1261-1268, 1983.

SHANNON, P.; VISHWANATH, R. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. **Animal Reproduction Science**, v.39, p.1-10, 1995.

SIDHU, R.S. et al. Accuracy of computer-assisted semen analysis in prefreeze and post-thaw specimens with high and low sperm counts and motility. **Urology**, v.51, n.2, p.306-312, 1998.

SILVA, R.P.M.; BUSTAMANTE FILHO, C.; TREIN, C. Relação entre a motilidade espermática e testes de termo-resistência no sêmen bovino congelado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Resumos...** Goiânia, 2005.

SOMFAI, T. et al. Effect of swim up and percoll treatment on viability and acrossome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, p.285-290, 2002.

SOZÁNSKA, A. et al. Simple optical method of qualitative assessment of sperm motility: preliminary results. **SPIE Proceedings**, v.59, p.176-184, 2005.

STORNELLI, M.C. et al. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinária**, v.25, n.2, p.28-35, 2005.

SUAREZ, S.S. Hyperactivated motility in sperm. **Journal of Andrology**, v.17, n.4, p.331-335, 1996.

SUAREZ, S.S.; VAROSI, S.M.; DAI, X. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. **Proceedings of The National Academy of the United States of America**, v.90, p.4660-4664, 1993.

SUGULLE, A.H.; BHUIYAN, M.M.U.; SHAMSUDDIN, M. Breeding soundness of bulls and the quality of their frozen semen used in cattle artificial insemination in Bangladesh. **Livestock Research for Rural Development**, v.18, article 54. Disponível em: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd18/4/sugu18054.htm>.> Acesso em: 26 Jan 2007.

TARDIFF, A.L. et al. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.8, p. 1606-1612, 1997.

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

THACKER, D.L.; ALQUIMIST, J.O. Diluters for bovine semen. I. Fertility and motility of bovine spermatozoa in boiled milk. **Journal of Dairy Science**, v. 36, p.173-180, 1953.

THATCHER, W.W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J.E.P. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v.55, p.75-89, 2001.

THOMAS, C.A. et al. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.58, p.786-793, 1998.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANET, F. Comparison of Biociphos-Plus® and Tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, v.57, n.3, p.1087-1094, 2002.

VASCONCELOS, J.L.M. et al. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle and conception rate after synchronization of ovulation with GnRH beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.52, p.1067-1078, 1999.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, n.1, p. 149-179, 2002.

VERBERCKMOES, S. et al. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology**, v.63, n.3, p.912-922, 2005.

VIANA, F.P. **Estudo sobre a eficiência dos testes de termorresistência (LENTO e RÁPIDO) em prever a fertilidade do sêmen congelado na espécie bovina.** 2004. 67p. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of Bovine Semen in Liquid and Frozen State. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.1-3, p.23-53, 2000.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.349-355, 2000.

WARD, F. et al. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility in vivo. **Molecular Reproduction and Development**, v.60, p.47-55, 2001.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, n.2, p.481-492, 2000.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v.24, p.438-450, 2001

WOODS, E.J. et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v.48, p.146-156, 2004.

ZHANG, B.R. et al. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an IA-programe. **International Journal of Andrology**, v.22, p.253-260, 1999.

9.0 -APÊNDICE

9.1 – Diluente para congelação de sêmen bovino Tris-gema de ovo-frutose (TRIS).

- Diluidor TRIS: SOLUÇÃO MÃE

CONSTITUINTES	QUANTIDADE
Tris	30,28 g
Ácido Cítrico	17,30 g
Frutose	12,5 g
Sulfato de Amicacina	0,25 g
Água Bi-Destilada/Deionizada	1000 mL/qsp
Volume Final	1000 mL

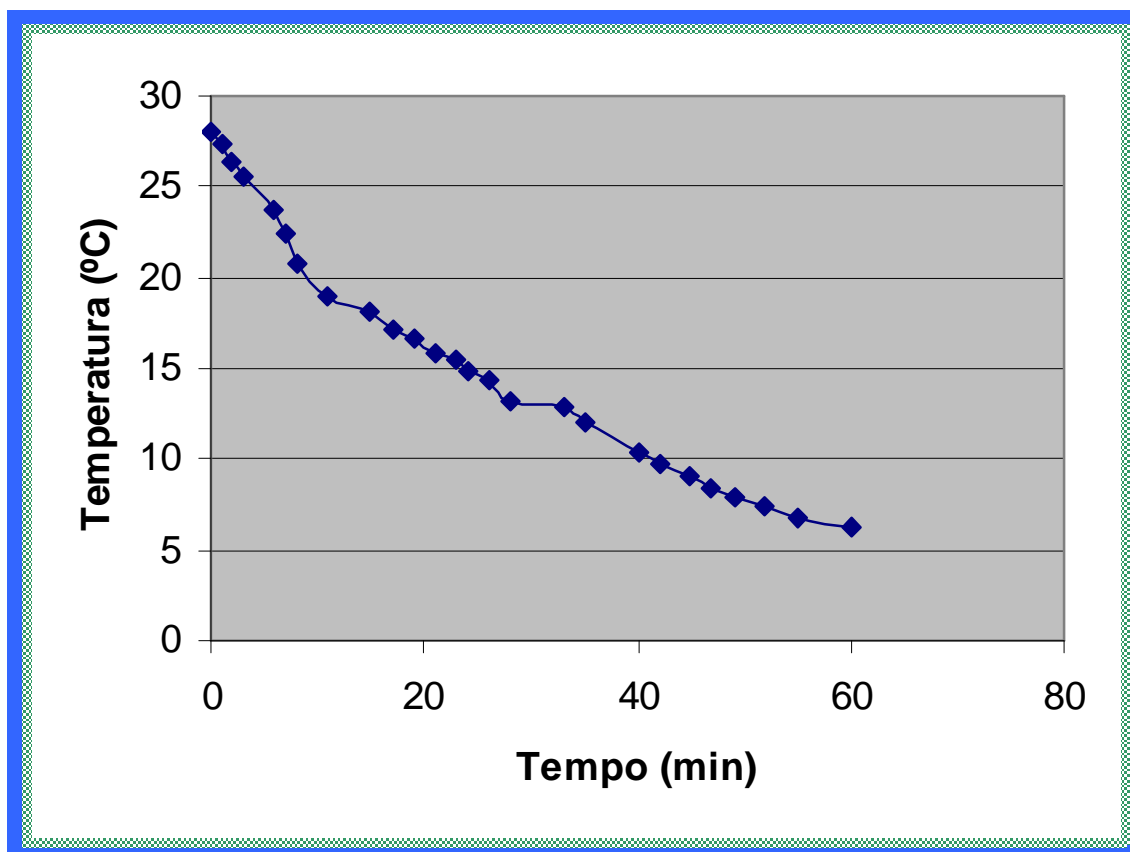
- Diluidor TRIS: FRAÇÃO-1

CONSTITUINTES	QUANTIDADE
Solução Mãe	800 mL
Gema de Ovo	200 mL
Volume Final	1000 mL

- Diluidor TRIS: FRAÇÃO-2

CONSTITUINTES	QUANTIDADE
Solução Mãe	672 mL
Gema de Ovo	200 mL
Glicerol	128 mL
Volume Final	1000 mL

9.2 – Curva de refrigeração da caixa de transporte de sêmen Botutainer® (Biotech Ltda – Botucatu/SP).



9.3 – Padrões adotados para a análise computadorizada do movimento espermático bovino através do aparelho Hamilton Thorn Research® Ivos-10/EUA.

<i>Padrão CASA</i>	
Número de Frames por segundo (Hz)	60
Número de Frames	50
Contraste celular mínimo para detecção	60
Tamanho mínimo da célula para detecção (pix)	6
Intensidade de luz	90
Velocidade mínima de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$)	30
Velocidade progressiva mínima (STR, $\mu\text{m/s}$)	20

9.4 – Soluções “estoque” para realização da coloração fluorescente empregada para a avaliação da integridade de membrana plasmática dos espermatozoides (IMP, %).

Soluções	Componentes	Quantidade
“Estoque” Iodeto de Propídeo (PI)	PI	10 g
	Solução Fisiológica	20 mL
“Estoque” Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA)	CFDA	9,2 g
	DMSO	20 mL
“Estoque” Formol Salino (FORM)	Formalina 40%	1 mL
	Solução Fisiológica	79 mL
“Estoque” Citrato de Sódio (Citrato- Na^+)	Citrato de Sódio	3 g
	Solução Fisiológica	100 mL

- **Solução de Trabalho:** 1,0 mL de citrato de sódio + 20 μL de formol salino + 60 μL de PI + 20 μL de CFDA. Acondicionar em frasco âmbar ou vedado contra luminosidade em geladeira.

Avaliação de Sêmen Bovino: 20 μL de sêmen + 40 μL de “estoque” citrato de sódio + 20 μL de solução de trabalho, avaliando-se às amostras em microscopia de epifluorescência

9.5 – Meio mDM (KESKINTEPE & BRACKETT, 1996) utilizado nas provas de separação espermática por *swim-up*.

9.5.1 – Solução “Stock”: solução salina ácida isotônica (SSAI)

SSAI	g/200 mL	g/400 mL
NaCl	1,3100	2,6200
KCl	0,0600	0,1200
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,0660	0,1320
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,0212	0,0424
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,0226	0,0452
Penicilina G (sal sódico)	0,0062	0,0124
PVA	0,2000	0,4000

9.5.2 – Meio mDM (Meio Definido Modificado)

Obs: para cada 40 mL da solução SSAI, adicionar os seguintes componentes:

mDM	g/40 mL	g/20 mL
Glicose	0,1000	0,0500
Bicarbonato de Sódio	0,1242	0,0621
Piruvato de Sódio	0,0055	0,0028
Penicilamina	0,0200	0,0100
Benzoato de Cafeína	0,0400	0,0200

Apartir da solução mDM “estoque”, proceder:

- Correção do pH para 7,8;
- Filtragem em acrodisc 0,22 µm;
- Estocagem em geladeira por período inferior a 10 dias.