

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA
PLASMÁTICA E CROMATINA NO SÊMEN BOVINO
CONGELADO**

**ASSESSMENT OF SPERM PLASMA MEMBRANE AND
CHROMATIN INTEGRITY IN FROZEN-THAWED BULL
SEMEN**

Tháise Silva Passos

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
MAIO – 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**“AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA
E CROMATINA NO SÊMEN BOVINO CONGELADO”**

**“ASSESSMENT OF SPERM PLASMA MEMBRANE AND
CHROMATIN INTEGRITY IN FROZEN-THAWED BULL SEMEN”**

THAÍSE SILVA PASSOS

Orientador: Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.
Área concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
MAIO – 2007

THAÍSE SILVA PASSOS

“Avaliação da integridade da membrana plasmática e cromatina no sêmen bovino congelado”

“Assesment of sperm plasma membrane and chromatin integrity in frozen-thawed bull semen”

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Produção Animal

APROVADO: 28/05/2007

Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari
Orientadora

Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva

Dra. Margot Alves Nunes Dode

*“A Deus,
Que com fidelidade tem conduzido minha
vida, me levando muito além de tudo que
eu possa imaginar, para que Suas
promessas se cumpram em minha vida e
eu alcance meus objetivos. A Ele dedico
mais esta conquista.”*

*“À minha família,
que é o alicerce da minha vida e que
sempre me incentivou a buscar o
conhecimento.”*

AGRADECIMENTOS

A Deus,

pelo dom da vida, por Seu amor e fidelidade instruindo-me no caminho que devo seguir e, pela possibilidade infinita de crescimento, que se manifesta a cada instante em minha vida.

À minha mãe,

pelo amor incondicional, exemplo de vida, coragem e dedicação... de quem se pode dizer “mulher virtuosa, quem a achará? O seu valor excede o de finas jóias... a força e a dignidade são os seus vestidos... fala com sabedoria e a instrução da bondade está na sua língua.... muitas mulheres procedem virtuosamente, mas tu a todas sobrepujas” *Provérbios 31:10-31*.

Aos meus irmãos,

Alisson Diogo, pela admiração, incentivo e, principalmente por me ensinar que um soldado é forjado no calor da batalha.

Michelle e Leandro, pelo apoio, orações, conselhos e por me mostrarem que o que nos une não são os laços de sangue, mas os do coração.

Aos meus avós,

Evanilde e Otacílio pelo amor incondicional, exemplo de sabedoria e dignidade, apoio e incentivo.

Aos meus tios, tias e primos, e em especial à Julia,

que torceram e vibraram com minhas conquistas, ainda que isso requeresse tantas vezes abrir mão da minha companhia.

Aos meus irmãos e companheiros de oração,

preciosos, amados, ousados, guerreiros que, em todo o tempo, intercederam junto ao Pai por mim.

À Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Morais,

pelo exemplo de dedicação profissional.

À Prof^a. Dr^a. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari,

pelo acompanhamento e orientação que resultaram na realização deste trabalho; pela oportunidade ímpar de crescimento e formação científica; pela confiança no meu potencial e disponibilização da linha de pesquisa em Biotecnologia do Sêmen de Touros; pelo rigor científico e de princípios éticos; pela compreensão e incentivo nos momentos difíceis e de intranqüilidade; meu reconhecimento, respeito e gratidão.

À Prof^a. Dr^a. Eliane Vianna da Costa e Silva,

exemplo de dedicação profissional e convivência enriquecedora, uma das primeiras a me incentivar na pesquisa científica, ainda na graduação; pelo apoio, fornecendo textos, materiais e sugestões importantes para realização deste trabalho, minha formação e crescimento profissional.

À Marilete, pela dedicada atuação na secretaria da pós-graduação do Mestrado e convivência agradável.

À Aline Figueiredo,

pela valiosa amizade, companheirismo, paciência, apoio sempre presente nas horas difíceis, desde a Graduação.

À colega Isabel Orro,

pela colaboração, constante troca de conhecimentos, convivência alegre e amiga.

Ao Dr Urbano Gomes Pinto de Abreu pelo apoio na estatística.

À Paula e Patrícia, acadêmicas de veterinária, pelo auxílio na execução do experimento.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para que essa etapa da minha vida fosse concluída satisfatoriamente.

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA E CROMATINA NO SÊMEN BOVINO CONGELADO

RESUMO

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar se testes laboratoriais, usados na identificação das lesões estruturais e funcionais da membrana plasmática e da integridade da cromatina, são efetivos para explicar as variações na taxa de gestação em programas de inseminação artificial. Foram usados os dados de campo da inseminação artificial de 2.036 fêmeas da raça Nelore, com sêmen de 22 touros da mesma raça. Avaliou-se a integridade funcional da membrana plasmática por meio do teste hiposmótico, a integridade estrutural da membrana plasmática pela coloração com eosina/nigrosina e da cromatina espermática por intermédio da sonda fluorescente *acridine orange* e do corante azul de toluidina. Houve efeito significativo ($p < 0,0001$) da estação de monta, touro e inseminador sobre a taxa de gestação, variáveis essas, que não foram controladas. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupamentos de touros quanto a percentagem de espermatozoides com cromatina lesada detectados pelo azul de toluidina ou *acridine orange*. Em função das avaliações seminais, quando consideradas isoladamente, a taxa de gestação não variou. A concentração da dose inseminante, motilidade, integridade estrutural e funcional da membrana plasmática e lesões na cromatina foram variáveis espermáticas importantes que individualmente não apresentaram correlação com a fertilidade *in vivo*, contudo as combinações entre elas explicaram cerca de 80% da variação na taxa de gestação, podendo ser usadas para avaliar a qualidade seminal de touros.

Palavras-chave: teste hiposmótico, *acridine orange*, azul de toluidina, fertilidade, touro

ASSESSMENT OF SPERM PLASMA MEMBRANE AND CHROMATIN INTEGRITY IN FROZEN-THAWED BULL SEMEN

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate whether laboratorial tests used in the identification of structural and functional sperm membrane damages and chromatin integrity, are effective to explain the variations in fertilization rate in programs of artificial insemination. Data from 2036 Nelore cows artificial inseminated with 22 different Nelore bulls were used. The sperm membrane functional integrity was evaluated with the hypoosmotic swelling test (HOST), and chromatin integrity with the fluorescent probe acridine orange and toluidine blue stain. Sperm concentration, motility, HOST and acridine orange accounted for 80% of variation in the fertilization rate. The laboratorial tests did not explain all fertility rate differences, however, there was significant on pregnancy rate ($p < 0.0001$) effect of season breeding, bull and technician. These were not controlled in the present. The number of sperm with chromatin damage detected by acridine orange or toluidine blue stain were not different ($p > 0.05$) among the bull groups. The concentration of the number of spermatozoa per insemination, motility, the functional integrity of plasma membrane and damage in the chromatin were important semen quality characteristics, that individually without correlation of with the fertility in vivo, although the combinations between these explained 80% of the variation in the fertilization rate, and they can be used to evaluate of the semen quality of bulls.

Keywords: hypoosmotic test, acridine orange, toluidine blue, fertility, bull

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Distribuição de inseminadores, touros e fêmeas de diferentes categorias reprodutivas submetidas à inseminação artificial nas fazendas 1 e 2..... 40
- Tabela 2. Avaliações funcional e estrutural da membrana plasmática e cromatina do sêmen congelado (média \pm desvio padrão) de 22 touros agrupados em três classes de taxa de gestação (1= $\leq 52\%$; 2= >52 a $<66,7\%$; 3= $\geq 66,7\%$)..... 45
- Tabela 3. Correlações entre as variáveis seminais, % de variância explicada e acumulada, nos diferentes modelos, para os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2).....46

SUMÁRIO

	“Página”
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Processo de Criopreservação.....	11
2.2 Avaliação Estrutural e Funcional do Sêmen	14
2.2.1 Influência da Motilidade na Fertilidade Espermática.....	16
2.2.2 Relação entre Morfologia Espermática e Fertilidade	17
2.2.3 Integridade da membrana plasmática.....	20
2.3 Avaliação Estrutural da Cromatina.....	24
2.3.1 A estrutura da cromatina espermática	24
2.3.2 Técnicas laboratoriais para avaliação da cromatina espermática	27
REFERÊNCIAS	31
INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAIS E MÉTODOS	39
<i>Análise física e morfológica do sêmen.....</i>	<i>40</i>
<i>Análise da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática</i>	<i>41</i>
<i>Análise da integridade estrutural da cromatina espermática</i>	<i>41</i>
<i>Análise estatística</i>	<i>42</i>
RESULTADOS.....	44
DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

O setor agropecuário tem grande importância na economia brasileira. De acordo com as estimativas do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA-USP/CNA) a retração das atividades do setor em 2006 teve impacto negativo sobre a economia. O PIB anual do setor pecuário foi de R\$ 64,82 bilhões, frente aos R\$ 67,84 bilhões de 2005, sendo que essa redução de R\$ 3,02 bilhões representou a diminuição não só na renda dos produtores rurais, mas na economia nacional.

A crise que o setor rural vem enfrentando nestes dois últimos ciclos agrícolas se deve à soma de vários fatores, sendo os mais relevantes: a valorização do real, a elevação dos custos agropecuários e queda da produtividade por motivos climáticos e problemas sanitários na pecuária (CEPEA-USP/CNA, 2006).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que, mundialmente, o Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos (204.512.737 cabeças), a região Centro-Oeste contribui com 34,8% (71.168.853 cabeças) desse rebanho, com o Mato Grosso do Sul ocupando o segundo lugar na região, tendo 24.715.372 de bovinos, atrás do Mato Grosso, que possui 25.918.998 cabeças (IBGE, 2004). Diante do que esses números representam na economia nacional é necessário, frente às adversidades enfrentadas atualmente pelo setor, buscar ferramentas que garantam o desempenho competitivo do agronegócio, contribuindo para o desenvolvimento do país.

No ano de 2005 houve uma queda de 6,05% na comercialização de sêmen, devido à retração de 14,6% na pecuária de corte. Apesar da crise, nos últimos cinco anos a venda de sêmen vem crescendo lentamente em número absoluto, tendo sido comercializados mais de cinco milhões de doses de sêmen nacional (ASBIA, 2006).

A fertilidade do touro tem grande impacto no desempenho reprodutivo do rebanho, principalmente com o uso de biotecnologias como a inseminação

artificial (IA), que permite disponibilizar, em curto espaço de tempo, uma grande quantidade de touros com patrimônio genético avaliado.

O uso de um touro com baixa fertilidade pode causar grandes prejuízos à produtividade do sistema, portanto os animais têm que ser provados quanto a sua eficiência reprodutiva, antes de serem disponibilizados para a IA.

O método mais seguro para medir a fertilidade de uma partida de sêmen congelado é a taxa de prenhez, ou através da taxa de não retorno ao cio, mas este processo é demorado e tem custo elevado. Diante disso tem-se buscado testes laboratoriais capazes de prever a fertilidade do macho, pois não há um teste único que confira uma avaliação completa dos reprodutores.

O presente trabalho teve como objetivo abordar associações de testes laboratoriais na identificação das lesões estruturais e funcionais da membrana plasmática e integridade da cromatina, buscando correlação entre os testes e entre estes e a fertilidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Processo de Criopreservação

O processo de criopreservação tem contribuição importante no incremento da produção bovina em rebanhos comerciais, nos quais a lucratividade depende da alta eficiência reprodutiva.

A congelação do sêmen, com o objetivo de conservar a capacidade fecundante do espermatozóide, o leva a um estado de quiescência, reduzindo seu metabolismo e proporcionando diminuição dos gastos energéticos e da produção de catabólitos, contribuindo assim para a preservação celular, além de aumentar o número de fêmeas fertilizadas com um único ejaculado (Watson, 2000).

Apesar de toda a evolução ocorrida nesse processo é esperada uma redução de aproximadamente 50% na proporção de espermatozoides viáveis,

pois devido ao estresse térmico, muitas células não resistem à congelação e morrem. No entanto, é necessário um número suficiente de espermatozóides que além de sobreviver, mantenham sua integridade estrutural e funcional para que ocorra o processo de fecundação (Watson, 1995).

O primeiro estresse térmico ocorre durante o processo de resfriamento, entre 20 e 5°C. O choque térmico ocorre se esse resfriamento for feito de forma inadequada, causando danos irreversíveis, caracterizados pelo padrão anormal de motilidade (circular ou retrógrada), rápido declínio da motilidade, acrossomo e membrana plasmática lesados, metabolismo reduzido e perda de componentes intracelulares. A maioria desses danos resulta de alterações ocorridas na membrana durante a refrigeração quando os fosfolipídios passam pela fase de transição, no entanto, esses efeitos podem ser reduzidos com o controle da taxa de resfriamento (Graham, 1996; Watson, 2000).

A organização das membranas espermáticas de acordo com o proposto por Singer e Nicolson (1972), apresenta proteínas entremeadas em uma camada dupla de fosfolipídios, que possuem uma parte hidrofílica voltada para o exterior e uma parte hidrofóbica, voltada para o interior da camada. Conforme Amann e Pickett (1987) essa disposição dos fosfolipídios promove uma barreira hidrofóbica, sendo que as proteínas funcionam como canais para transportar a água e as moléculas dissolvidas para dentro da célula. Quando há um rearranjo anormal da membrana, as moléculas passam a entrar rapidamente na célula. De acordo com Parks e Graham (1992) esse rearranjo, chamado fase hexagonal II, ocorre quando fosfolipídios, cujas cadeias de ácidos graxos são muito polinsaturadas, permitem assumir uma forma cônica, com as extremidades hidrofóbicas posicionadas externamente e as hidrofílicas internamente, ao contrário da disposição normal da membrana. Esse fato pode ocorrer durante o resfriamento e transição da fase fluida para gel, sendo transitório ou irreversível.

O efeito da criopreservação na sobrevivência dos espermatozóides depende da taxa de congelação. O ponto de congelação do citoplasma celular, geralmente está abaixo de -1°C , mas, entre -10 e -15°C as células não congelam, permanecem super resfriadas, mesmo com formação de cristais de

gelo no meio extracelular. É importante a integridade da membrana plasmática para impedir a entrada desse gelo na célula. A água super resfriada no interior da célula tem maior pressão de vapor que o gelo, então a célula perde água até atingir o equilíbrio. Como resultado dessa desidratação há a concentração intracelular de soluto e diminuição do tamanho da célula (Mazur, 1970; Meyers, 2005).

A taxa de congelação lenta o suficiente para a saída da água da célula, previne a formação de gelo intracelular, mas permite um aumento da concentração de soluto, e isso pode causar injúria pelo efeito de solução. Se a taxa de congelação for rápida ($\geq -60^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) resultará na formação de cristais de gelo intracelular, e esses cristais podem causar danos, sendo ainda mais grave se, ao descongelar, ocorrer a recristalização formando grandes cristais de gelo dentro da célula. Portanto, a taxa de congelação tem que ser lenta o suficiente para prevenir a produção intracelular de gelo e, rápida o suficiente para minimizar o tempo de exposição ao efeito de solução (Mazur, 1970; Graham, 1996).

Os crioprotetores são adicionados ao meio diluidor para reduzir o ponto de congelação e proteger as estruturas espermáticas durante a congelação e descongelação. O glicerol é o crioprotetor mais usado, e atua aumentando o volume de solvente não congelado e diluindo a concentração de soluto. Uma alta concentração pode ser prejudicial se permitir uma desidratação que leve a deformação estrutural da membrana, alteração ou desnaturação das proteínas e separação das estruturas do citoesqueleto. Contudo, uma concentração alta de crioprotetor é tóxica para os espermatozóides e pode resultar em taxa de fertilidade menor (Graham, 1996).

Durante a descongelação há a remoção do glicerol intracelular e o influxo de água para dentro da célula. Considerando ser a difusão da água 30 a 60 vezes mais rápida que a do glicerol, a célula pode dobrar o volume inicial antes que o glicerol saia, podendo a lesão ocorrer pelo aumento do volume ou pelo estresse osmótico, devido à permanência do glicerol e a alta concentração de soluto (Hammerstedt *et al.*, 1990).

A taxa de descongelamento depende da taxa de congelamento, ou seja, se o espermatozóide foi congelado a uma taxa lenta, também deve ser descongelado assim, para que haja tempo suficiente do gelo extracelular descongelar e a água reingressar diluindo o meio intracelular. Se a taxa de congelamento foi rápida a descongelamento também deverá ser, porque o espermatozóide não se desidratou expressivamente na congelamento, então terá água intracelular para diluir os solutos. Na descongelamento rápida a água intracelular, rapidamente descongelada, não terá tempo para recristalizar, o que pode acontecer na descongelamento lenta formando grandes cristais de gelo (Graham, 1996).

2.2 Avaliação Estrutural e Funcional do Sêmen

Muitos são os atributos e etapas necessários para o espermatozóide fecundar o ovócito, dentre o quais se destacam: motilidade progressiva, integridade das membranas plasmática e acrossomais, capacitação, ligação à zona pelúcida e reação do acrossomo, penetração no citoplasma e capacidade do núcleo se descondensar e permitir o desenvolvimento embrionário (Amann e Hammerstedt, 1993). Para estimar a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen, essas variáveis são identificadas e avaliadas em busca da correlação com a fertilidade *in vivo* (Graham e Mocé, 2005).

Por não existir um teste único capaz de prever a habilidade fecundante dos espermatozoides, pesquisadores têm buscado a melhor associação de testes estruturais e funcionais, que permita estimar a integridade das células espermáticas e apresente alta correlação com as taxas de prenhez (Januskauskas *et al.*, 2001).

No espermiograma de rotina é feita a avaliação físico-morfológica de algumas características seminais, tais como: volume, aspecto, concentração, motilidade e morfologia espermáticas. A motilidade e a morfologia são as características mais usadas para estimar a fertilidade. No entanto, Rodriguez-

Martinez (2005), em trabalho de revisão, relatou que apesar de significativas, as correlações entre motilidade e fertilidade têm grande variação entre estudos (0,15 – 0,83).

Além dos parâmetros da análise de rotina, os trabalhos científicos têm mostrado a necessidade de avaliações mais detalhadas, dentre elas, integridade da membrana plasmática, percentagem de vivos e mortos e integridade da cromatina, que apresentem correlação com fertilidade (Correa *et al.*, 1997; Rodriguez-Martinez, 2005).

O ejaculado contém várias subpopulações espermáticas, produto de diferentes ondas espermatogênicas, maturadas ao longo do epidídimo e estocadas na cauda como diferentes grupos de células. Portanto, o ejaculado é uma suspensão heterogênea de espermatozóides, com morfologia, motilidade, qualidade e quantidade de material genômico diferentes (Rodriguez-Martinez, 2006).

A heterogeneidade da população espermática, entre indivíduos e entre ejaculados do mesmo indivíduo, deve ser considerada nos critérios de avaliação seminal, pois conforme observaram Evenson *et al.* (1980), o aumento dessa heterogeneidade pode ser decorrente de distúrbios na espermatogênese, o que conduz ao aumento das anormalidades morfológicas e redução da fertilidade.

A fecundação é um processo multifatorial que depende da expressão de todos os atributos espermáticos, no tempo e no local certos, e que a população total de espermatozóides contenha um suficiente potencial fecundante (Amann e Hammerstedt, 1993).

Dentre os fatores contribuintes para o sucesso da fertilização está, também, o número de espermatozóides necessário por inseminação visando obter resultados aceitáveis de fertilidade, pois é um ponto importante para a indústria da IA. Casagrande *et al.* (1980a) trabalhando com sêmen congelado, distribuído em rebanhos de diferentes regiões do país, observaram correlação significativa ($r=0,25$; $p=0,001$) entre número de espermatozóides e fertilidade. Considerando a patologia espermática total de até 20%, defeitos maiores até

15% e menores até 10% a fertilidade não variou entre as partidas contendo de 7×10^6 a 80×10^6 células espermáticas.

Foote e Kaproth (1997) testaram a fertilidade do sêmen de touros, envasado em palhetas de 0,5 mL, com concentrações de 10×10^6 a 40×10^6 espermatozóides, e concluíram que, em boas condições de coleta, processamento e inseminação, a alta fertilidade se mantém com 10×10^6 espermatozóides/palheta. Den Daas *et al.* (1998) estimaram o número mínimo de espermatozóides/palheta que não comprometesse os resultados da IA em bovinos, utilizando os resultados de 20 touros com pelo menos 200 inseminações cada. Ao trabalharem com palhetas de 0,25 mL e concentração variando entre $2,1 \times 10^6$ e $17,3 \times 10^6$, a taxa de concepção se manteve entre 82 e 90% independente da concentração da dose inseminante.

2.2.1 Influência da Motilidade na Fertilidade Espermática

A avaliação subjetiva da motilidade, pós-descongelamento, é um parâmetro usado para determinar a qualidade do sêmen de touros destinados à IA. Assim, Correa *et al.* (1997) observaram correlação ($r=0,53$; $p<0,01$) entre a motilidade pós-descongelamento e fertilidade, com diferença significativa entre touros de baixa ($r=0,39$; $p<0,01$) e alta ($r=0,61$; $p<0,01$) fertilidade, indicando que essa diferença se deve às variações na qualidade dos espermatozóides.

Na busca de maior objetividade na avaliação da motilidade pós-descongelamento, pode ser usada a análise computadorizada (CASA). No entanto, Januskauskas *et al.* (2001) compararam a avaliação subjetiva e a computadorizada e os resultados não diferiram significativamente ($62,8 \pm 6,5$ e $72,4 \pm 9,9\%$, respectivamente). Houve correlação entre motilidade espermática e fertilidade para ambas as avaliações ($r=0,66 - 0,67$; $p<0,001$ para a subjetiva; $r=0,53 - 0,57$; $p<0,05$ para a CASA).

Zhang *et al.* (1998) obtiveram, para sêmen congelado de touros, correlação positiva entre motilidade linear x fertilidade ($r=0,45 - 0,59$; $p<0,01$) e entre motilidade x concentração pós *swim-up* ($r=0,43 - 0,63$; $p<0,01$),

sugerindo ser a avaliação da motilidade útil para estimar a fertilidade, quando combinada a outros parâmetros espermáticos.

Em bovinos, a motilidade ($r=0,53$; $p<0,05$) e a integridade da membrana ($r=0,59$; $p<0,01$) pós-descongelação podem ser bons indicadores de viabilidade, por apresentarem correlação significativa com a fertilidade a campo (Januskauskas *et al.*, 2000).

Christensen *et al.* (2005) observaram para sêmen a fresco e congelado de touro uma maior correlação entre motilidade, avaliada subjetivamente, e taxa de não retorno ao cio (TNR) aos 56 dias ($r=0,48$ e $0,55$, respectivamente) do que entre viabilidade da membrana plasmática, avaliada com citômetro de fluxo, e TNR aos 56 dias ($r=0,32$ e $r=0,41$, respectivamente). Apesar da correlação entre a viabilidade espermática e TNR ter sido menor que a correspondente com motilidade, os autores sugerem o método em que o citômetro de fluxo foi usado como melhor ferramenta para descarte do sêmen de pobre qualidade, devido a maior precisão da avaliação.

2.2.2 Relação entre Morfologia Espermática e Fertilidade

Considerando a importância econômica e biológica de estimar o potencial fecundante e monitorar a função testicular de touros usados nos programas de IA, se faz a avaliação morfológica, devido à relação desta com a fertilidade (Januskauskas *et al.*, 2001). Porém, essa correlação (0,06 a 0,86) apresenta-se bastante variável, como relatou Rodriguez-Martinez (2005) em trabalho de revisão.

As anormalidades morfológicas, inicialmente, foram classificadas por Blom (1950), citado por Barth e Oko (1989), em primárias, as que têm origem nos testículos durante a espermatogênese, e secundárias aquelas que se originam após os testículos. Esse sistema de classificação foi revisto por Blom (1973), citado por Barth e Oko (1989), e passou a ser dividido em defeitos maiores e menores, de acordo com o prejuízo causado à fertilidade.

Em trabalho de revisão, Chenoweth (2005) relatou que a redução da fertilidade pode ocorrer por falhas dos espermatozóides em atingirem o local da fecundação, o que envolve motilidade e transporte no trato genital da fêmea, ou falhas na fecundação do ovócito e manutenção do desenvolvimento embrionário. No primeiro caso, os defeitos podem ser compensados com o aumento do número de células espermáticas na dose inseminante, já no segundo caso, as falhas não podem ser compensadas porque o aumento da concentração de espermatozóides não levará à melhoria na fertilidade.

Com o objetivo de encontrar os limites de patologia espermática total, defeitos maiores e menores para sêmen congelado de touros, Casagrande *et al.* (1980b) trabalharam com 191 partidas de sêmen bovino em rebanhos de diferentes regiões do país e verificaram ($p=0,001$) correlação negativa significativa entre fertilidade e patologia total ($r= -0,48$) e defeitos maiores ($r= -0,51$). Também observaram correlação negativa entre fertilidade e defeitos menores ($r= -0,16$; $p=0,005$). A maioria das partidas com boa fertilidade apresentou menos de 20% de patologia espermática, e 15% de defeitos maiores. Enquanto partidas acima de 30% de patologia espermática e 20% de defeitos maiores tiveram baixa fertilidade.

Dentre as anormalidades morfológicas, as localizadas na cabeça e cauda são importantes responsáveis pela redução da fertilidade, sendo a piriforme o defeito de cabeça de maior impacto sobre a fertilidade. Como observaram Thundathil *et al.* (1999), um touro com alta percentagem de piriforme (85%) apresentou redução significativa ($p=0,01$) da fertilidade (68,5%) quando comparado ao controle (84,4%), porém, sem aumento da mortalidade embrionária (23 e 8%; $p=0,55$, respectivamente).

Outra alteração morfológica de cabeça é o *knobbed sperm*, um defeito acrossomal, de origem genética, em que o espermatozóide apresenta o ápice do acrossomo denteado ou achatado, e aparece como conseqüência de distúrbios na espermatogênese e pode afetar a fertilidade, pois dependendo da severidade do defeito, a célula espermática com essa alteração é incapaz de penetrar a zona pelúcida (Barth e Oko, 1989; Thundathil *et al.*, 2001).

Thundathil *et al.* (2001) trabalharam com dois touros, K1 com 92% de espermatozoides com acrossomo achatado e K2 com 82% de acrossomo denteado. O número de células espermáticas que se ligaram à zona pelúcida foi significativamente menor ($p < 0,05$) para os touros K1 ($6,9 \pm 1,0$) e K2 ($2,6 \pm 0,5$), quando comparados ao touro controle ($19,7 \pm 2,5$). As células espermáticas com esse defeito além de não serem aptas a penetrar a zona pelúcida, tenderam a sofrer reação do acrossomo espontânea pós-descongelamento, sugerindo que esses espermatozoides são mais suscetíveis aos danos causados pela criopreservação e têm a interação espermatozoide-ovócito prejudicada.

Os efeitos de vacúolos múltiplos (*pouch formation*, crateras, diademas) sobre a fertilidade de touros foram investigados por Thundathil *et al.* (1998). Ovócitos bovinos foram inseminados com sêmen congelado de um touro (A) com 60% dos espermatozoides com vacúolos nucleares múltiplos. O número médio de espermatozoides ligados a zona pelúcida foi menor ($p < 0,05$) para o touro A ($85,7 \pm 5,7$) do que para o touro controle ($108,9 \pm 5,4$), mas a percentagem de espermatozoides que penetraram a zona pelúcida não diferiu significativamente (75% e 77%, respectivamente). Não se observou diferença na taxa de fecundação entre os touros (74 e 77%). Os dados sugerem que espermatozoides com vacúolos nucleares múltiplos têm problemas na ligação à zona pelúcida. No entanto, aqueles que acessam o ooplasma, participam da fertilização e desenvolvimento embrionário. A redução da fertilidade observada *in vivo*, possivelmente se deve a reduzida habilidade desses espermatozoides atravessarem o trato reprodutivo da fêmea.

Durante a espermatogênese pode ocorrer falha na eliminação das células germinativas anormais, levando à redução da fertilidade pelo alto número de espermatozoides com defeito. Os espermatozoides morfológicamente anormais podem ter quebras no DNA, o que resulta em estrutura anormal da cromatina devido a distúrbios na espermatogênese e, como consequência haverá altas proporções de células espermáticas anormais e fertilidade reduzida. Januskauskas *et al.* (2003) relataram correlação negativa entre cromatina lesada e fertilidade ($r = -0,33$ a $-0,51$; $p < 0,05$).

Lesões na estrutura da cromatina espermática apresentaram correlação significativa com defeitos maiores ($r=0,71$; $p<0,05$). Embora alguns dos defeitos menores tenham origem no epidídimo, mesmo local da compactação final da cromatina, a correlação encontrada foi de média intensidade ($r=0,44$; $p<0,05$), sugerindo que as anormalidades da cromatina desenvolvidas no epidídimo são menos freqüentes e têm menor influência sobre a morfologia espermática (Beletti e Mello, 2004).

As anormalidades de cabeça nem sempre são acompanhadas por alteração morfológica evidente, da mesma forma que esta não é necessariamente seguida por anormalidades na condensação da cromatina. Touros cujos espermatozóides apresentaram anomalias mais severas na cromatina, também tiveram assimetria da cabeça, embora isto não seja uma regra (Beletti *et al.*, 2005a).

Ao comparar características morfométricas de *Bos taurus* e *Bos indicus*, Beletti *et al.* (2005b) observaram que os zebuínos têm espermatozóides menores e menos elípticos, mas a média da área das cabeças foi similar em ambas as espécies indicando que as diferenças de tamanho e forma não interferem na capacidade de fertilização.

2.2.3 Integridade da membrana plasmática

A membrana plasmática tem a função de permitir o transporte seletivo de moléculas através da célula, sendo sua integridade importante para que ocorram as reações necessárias à união dos gametas masculino e feminino. A avaliação da integridade funcional da membrana plasmática é útil para estimar a fertilidade de um reprodutor (Jeyendran *et al.*, 1984).

Graham e Mocé (2005) definem integridade da membrana plasmática como sinônimo de viabilidade espermática. Durante a criopreservação há desestabilização da membrana, formação de cristais de gelo, transição dos lipídios da fase fluida para gel e, como conseqüência, pode ocorrer rompimento da membrana, perda de componentes intracelulares e morte da célula.

O teste hiposmótico (HOS) avalia a integridade funcional da membrana plasmática e, estando intacta, quando o espermatozóide é incubado em solução hiposmótica ocorre o influxo de água até que seja atingido o equilíbrio osmótico. Como consequência desse processo a membrana se expande causando o enrolamento da cauda, um processo fisiológico, mas, se a membrana estiver danificada, essa reação não se dará (Jeyendran *et al.*, 1984).

A motilidade depende das trocas que ocorrem através da membrana plasmática, por isso sua integridade é importante. Correa e Zavos (1994) encontraram correlação significativa entre motilidade espermática e enrolamento da cauda ($r=0,73$; $p<0,05$), após o choque hiposmótico. A proporção de espermatozoides com membrana intacta e bioquimicamente ativa, após o teste hiposmótico, foi 20% menor que a proporção de móveis antes do teste, indicando que a membrana de algumas células foram danificadas ou inativadas no processo de congelação ou descongelação.

A divisão dos touros em reprodutores de alta e baixa fertilidade permitiu que Correa *et al.* (1997) fizessem observações considerando uma classificação de enrolamento de cauda estabelecida por esses autores. Para touros de alta fertilidade o aparecimento de células com cauda mais enrolada (tipo A) foi mais significativo ($r=0,53$; $p<0,01$). Já, em touros de baixa fertilidade foi significativa a correlação ($r=0,20$; $p<0,05$) com células que apresentaram enrolamento apenas na extremidade da cauda (tipo C).

Anzar *et al.* (1997) trabalharam com sêmen congelado de touros para determinar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides separados em coluna de Sephadex e a proteção conferida pelo glicerol durante a congelação. As percentagens de acrossomo normal (AN), membrana plasmática intacta (IMP) e dobramento de cauda obtidas (HOS), foram significativamente melhores nos espermatozoides filtrados do que nos não filtrados, sendo de $52,1 \pm 10,5$ e $35,0 \pm 7,4$ ($p=0,0001$); $35,3 \pm 6,9$ e $23,3 \pm 3,9$ ($p=0,0008$); $19,3 \pm 3,8$ e $13,0 \pm 1,3$ ($p=0,003$), respectivamente. Os resultados do AN, IMP e HOS foram influenciados pela adição de glicerol, como pode ser visto ao comparar as percentagens médias dos filtrados com e sem glicerol:

86,5 ± 2,2 e 17,7 ± 3,1 ($p < 0,01$); 56,5 ± 3,9 e 14,0 ± 4,1 ($p < 0,01$); 31,7 ± 1,5 e 7,6 ± 1,5 ($p < 0,05$), respectivamente.

Os espermatozoides são desafiados sob condições hiperosmóticas, durante o processo de congelação, quando a concentração intracelular de solutos aumenta muito, podendo afetar a integridade da membrana plasmática e a motilidade espermática de formas diferentes. O rompimento da membrana plasmática leva à perda da viabilidade celular, mas uma membrana intacta não a garante. Liu e Foote (1998) trabalharam com sêmen bovino e observaram que na solução com osmolaridade de 100 e 150 mOsm/L a motilidade foi significativamente ($p < 0,05$) menor (5 e 19%, respectivamente) que a percentagem de espermatozoides não corados com vermelho congo (18 e 35%, respectivamente), mostrando que a membrana plasmática foi mais resistente a danos osmóticos do que os mecanismos responsáveis pela motilidade.

Rota *et al.* (2000) avaliaram o sêmen congelado de touros para verificar se os resultados do HOS se correlacionavam com a habilidade fecundante *in vitro*. As análises foram feitas pós-descongelação, pós seleção em gradiente de Percoll e pós capacitação em meio contendo heparina. O HOS foi importante para identificar a integridade funcional da membrana plasmática. Apesar dos touros terem fertilidade *in vitro* semelhante, houve diferença ($p < 0,01$) na resposta ao HOS. Não houve correlação significativa entre a percentagem de espermatozoides com cauda enrolada e a fertilidade *in vitro*, pois existem outras variáveis que interferem no potencial fecundante dos gametas.

A associação do corante supravital ao teste hiposmótico auxilia na avaliação do sêmen congelado de bovinos. Entre os corantes que podem ser usados está a eosina-nigrosina, útil para detectar a integridade física da membrana plasmática, enquanto o teste hiposmótico avalia se a mesma está bioquimicamente ativa, já que a capacitação espermática, reação do acrossomo e fusão do espermatozoide ao ovócito requerem uma membrana estruturalmente intacta e bioquimicamente ativa. Correa e Zavos (1994) obtiveram para a solução de 100 mOsm/L, o número máximo de caudas enroladas ($48,0 \pm 4,7$), e os resultados do corante supravital indicaram a média

de $56,6 \pm 5,4$ células com membrana íntegra. Observaram também alta correlação entre percentagem de células com membrana intacta e espermatozóides reativos ao teste hiposmótico ($r=0,81$; $p<0,05$).

O teste HOS fornece informações sobre a integridade da membrana plasmática na cauda, e a associação com a eosina permite avaliar também a região da cabeça. Ducci *et al.* (2002) usando essa associação avaliaram a integridade da membrana plasmática de espermatozóides de coelho em três momentos (0, 5 e 30 minutos) pós-colheita. Houve aumento no número de caudas enroladas com o passar do tempo ($T0 = 67,86 \pm 4,28$; $T5 = 72,86 \pm 3,28$; $p<0,05$ e $T30 = 75,14 \pm 6,5$; $p<0,05$). Viram também que a redução da fertilidade dos ejaculados com altas percentagens de motilidade, pode ser devido a presença de espermatozóides tipo 2 (cauda enrolada e cabeça corada), ou seja, aqueles que têm a membrana plasmática lesada na região da cabeça permitindo a entrada do corante, mas íntegra na região da cauda e, que responde ao choque hiposmótico.

A integridade da membrana plasmática vem sendo estudada por diferentes técnicas e a combinação das técnicas têm ajudado a explicar as variações encontradas. Tartaglione e Ritta (2004) explicaram 78% da variação na taxa de fertilização quando combinaram os resultados do teste hiposmótico com os da eosina/nigrosina. Esses autores encontraram 69,8% de espermatozóides vivos na avaliação com o corante supravital e 58,8% de células com cauda enrolada. Combinando os dois testes foi possível reduzir o número de falsos positivos e aumentar a habilidade para detectar uma membrana plasmática íntegra, obtendo então 51,2% de espermatozóides vivos e com cauda enrolada.

Thundathil *et al.* (2002) partindo do pressuposto de que ejaculados com alta proporção de defeito de acrossomo (*knobbed sperm*) apresentariam baixa fertilidade, submeteram doses de sêmen congelado de touros ao teste hiposmótico, compararam grupo controle (N) e grupo com alta percentagem de *knobbed sperm* (K1=93% de acrossomo achatado; K2=84% de acrossomo denteado). A resposta ao HOS foi maior ($p<0,05$) no grupo N ($68,8 \pm 2,4$) do que no K1 ($36,1 \pm 4,6$) e K2 ($40,2 \pm 4,7$). A perda da integridade funcional da

membrana plasmática predispõe à capacitação prematura e reação do acrossomo, logo o espermatozóide perde a habilidade de se ligar ao ovócito e penetrar a zona pelúcida, sugerindo que a explicação para a redução da fertilidade está associada ao *knobbed*.

2.3 Avaliação Estrutural da Cromatina

2.3.1 A estrutura da cromatina espermática

Durante o processo da espermiogênese as espermátides arredondadas são transformadas em espermatozóides, passando da forma esferoidal para achatada e alongada, devido a uma série de modificações morfológicas que incluem a condensação da cromatina nuclear, formação da cauda do espermatozóide e desenvolvimento do capuchão do acrossomo (Barth e Oko, 1989; Hafez e Hafez, 2004).

É também durante a espermiogênese que as histonas, ricas em lisina, são substituídas pelas protaminas, ricas em arginina e cisteína. Os resíduos de cisteína sofrem oxidação do grupo tiol formando grande número de ligações dissulfeto, reação que ocorre especificamente durante a maturação do espermatozóide no epidídimo. As protaminas se tornam altamente alfa-helicoidadas e se ligam ao DNA possibilitando às duplas hélices se compactarem e assim conferirem ao núcleo do espermatozóide estabilidade, para que o complexo desoxiribonuclear-protéico (DNP) seja resistente à desnaturação. Portanto, a cromatina espermática resulta da associação entre o DNA e as protaminas (Unanian, 2000).

Beletti *et al.* (2005a) explicam que na maioria dos mamíferos a cromatina espermática possui dois tipos de protamina (P1 e P2), e que alterações na proporção destas protaminas são causa importante de anormalidades na cromatina. No entanto, as células espermáticas dos bovinos têm somente um tipo de protamina, o que sugere que as alterações na cromatina desta espécie sejam ocasionadas por outros fatores.

A cromatina espermática é uma estrutura complexa e altamente organizada, que protege o DNA para que ocorra a transmissão precisa da informação genética às gerações futuras. Tem-se observado, em humanos, correlação negativa entre fertilidade, *in vivo* ou *in vitro*, e a porcentagem de DNA danificado. Qualquer anormalidade no DNA pode resultar em infertilidade do macho, tendo já sido observado um decréscimo progressivo na fertilidade quando mais de 30% das células espermáticas apresentam lesões (Agarwal e Said, 2003).

O citômetro de fluxo vem sendo usado para avaliar a motilidade, concentração total e morfologia espermática, com o uso de sondas fluorescentes específicas que se ligam aos diferentes compartimentos do espermatozóide (Evenson *et al.*, 1980; Ellington *et al.*, 1998; Januskauskas *et al.*, 2001; Januskauskas *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2005). Na avaliação da estrutura da cromatina espermática (SCSA) o corante usado é o *acridine orange* (AO), para determinar a suscetibilidade do DNA à desnaturação ácida. De acordo com Love (2005) os resultados são interpretados como a população principal, formada por espermatozoides com cromatina íntegra, que fluorescem em verde e graficamente a distribuição dessa população apresenta forma elíptica; a porcentagem de células fora da população principal, que fluorescem em vermelho e aparecem à direita da população principal e, recentemente passou a ser chamada de índice de fragmentação do DNA (células vermelhas + [vermelhas/ vermelhas + verdes]).

Evenson e Jost (2000) em estudo com humanos, touros, garanhões e cachacos, relataram que a porcentagem de espermatozoides com DNA desnaturado, expressa pelo índice de fragmentação do DNA (DFI), têm permitido classificar o potencial de fertilidade em baixo ($\geq 30\%$), moderado (16 – 29%) e alto (0 – 15%), e, em casos de esterilidade os valores foram de 80 – 90%. Quando o sêmen é submetido a técnicas de seleção como o *swim-up*, há o aumento da porcentagem de células móveis e remoção das mortas, e se $\geq 27\%$ dos espermatozoides estiverem com DNA lesado, não resultará em gestação.

Em trabalho de revisão Erenpreiss *et al.* (2006) relataram que a fragmentação do DNA é freqüente em homens subférteis, mas o efeito biológico de anormalidades na estrutura da cromatina espermática depende também da capacidade do ovócito reparar alguns danos. Durante a espermatogênese as quebras no DNA são necessárias para a substituição das histonas por protaminas, no entanto se essas quebras temporárias não forem devidamente reparadas, os espermatozóides terão DNA fragmentado. As causas mais freqüentes de anormalidades na estrutura da cromatina são: deficiência na recombinação durante a espermatogênese conduzindo a apoptose da célula; maturação anormal da espermátide; e estresse oxidativo (Agarwal e Said, 2003).

A baixa condensação da cromatina pode causar danos no DNA, como a presença de fitas quebradiças, que pode ser em parte, devido ao estresse oxidativo ou a qualquer outro insulto. No entanto, alguns espermatozóides com anormalidades na cromatina fecundam ovócitos *in vitro* e *in vivo*, porém se o defeito no DNA persistir durante o período embrionário pode induzir a morte embrionária e ao aborto (Ellington *et al.*, 1998).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) incluem os radicais livres que são agentes oxidativos produzidos pelo espermatozóide por um processo fisiológico, necessário para que ocorra a capacitação e a reação do acrossomo. No entanto, Lopes *et al.* (1998) observaram que o sêmen de baixa qualidade tem maior produção de ROS e é mais suscetível às lesões no DNA em consequência do estresse oxidativo, podendo afetar a fertilidade. Quando o sêmen foi exposto por mais de uma hora à xantina/xantina oxidase observou-se aumento significativo ($p=0,0001$) dos defeitos no DNA, mas o tratamento prévio com antioxidantes os diminuíram significativamente ($p<0,04$).

Madrid-Bury *et al.* (2005), trabalhando com touros, não encontraram correlação entre condensação da cromatina, e fertilidade a campo, expressa pela TNR 90 dias (60 – 80%). No entanto, utilizando o EDTA, que age quelando a protamina, e detergentes como SDS, que rompem a ligação não covalente, obtiveram correlação significativa ($r=0,66$; $p<0,001$) entre fertilidade e estabilidade da cromatina. Isso mostra que a avaliação da cromatina pode

ser uma ferramenta complementar nos trabalhos de rotina e identificação de reprodutores com anormalidades.

2.3.2 Técnicas laboratoriais para avaliação da cromatina espermática

As avaliações laboratoriais são importantes porque têm ajudado a identificar e eliminar da IA partidas de sêmen com baixa qualidade espermática (Amann e Hammerstedt, 1993; Graham e Mocé, 2005).

Testes laboratoriais como *acridine orange* (AO), azul de toluidina (ATOL) e reação de Feulgen, foram concebidos para obter informações sobre a estabilidade da cromatina em sêmen humano e animal (Evenson *et al.*, 1980; Tejada *et al.*, 1984).

A estrutura da cromatina espermática é normalmente resistente à desnaturação do DNA, mas quando alterada se torna suscetível. O corante fluorescente AO avalia a estabilidade do DNA à desnaturação ácida ou pelo calor, assim, se intercala à fita dupla íntegra de DNA e fluoresce em verde, no entanto se lesada emitirá fluorescência vermelho/alaranjada, permitindo contar o número de células com DNA desnaturado (Evenson *et al.*, 1980; Tejada *et al.*, 1984).

Evenson *et al.* (1980) relatam que o nível de desnaturação do DNA pode ser determinado dividindo o número de espermatozóides que fluorescem em vermelho pelo número total (verdes + vermelhos), e o resultado varia de 0,1 (íntegros) a 0,9 (altamente desnaturados). Encontraram para touros de alta fertilidade valores de $0,1 \pm 0,04$ para o sêmen não tratado pelo calor, e de $0,16 \pm 0,12$ quando o sêmen foi tratado pelo calor.

A coloração com ATOL detecta os espermatozóides com DNA fragmentado. Assim, no espermatozóide anormal a cromatina está pouco condensada e, o complexo DNP estando alterado, haverá um maior número de grupos fosfato disponível para a ligação com o corante, sendo então observada uma coloração azul escuro a violeta. No entanto, se a cromatina estiver íntegra

a coloração produzida será azul clara porque no espermatozóide normal a mesma está altamente compactada (Mello, 1982).

A propriedade metacromática do ATOL é interessante para avaliar alterações na cromatina espermática. As amostras de sêmen são coradas em pH 4,0 para evitar que as moléculas do corante se liguem a outros sítios que não os grupos fosfato do DNA. A hidrólise ácida, antes da coloração, tem por objetivo aumentar a sensibilidade do processo, extraíndo as proteínas nucleares da cromatina alterada, expondo os grupos fosfato do DNA para a ligação com o corante, pois na célula normal, a cromatina altamente compactada, é pouco afetada pela hidrólise e se cora em azul claro (Beletti *et al.*, 2004).

A reação de Feulgen também pode ser usada para avaliar a condensação da cromatina. A célula submetida à hidrólise ácida, depois ao corante de Schiff (a base de fucsina) e analisada ao microscópio de contraste de fase, cora em magenta o núcleo da célula normal. Já, a célula lesada fica esbranquiçada, forma halos claros, semelhantes a vesículas distribuídas na região da cabeça, que representam lesões na cromatina (Barth e Oko, 1989; Mello, 1997).

Januskauskas *et al.* (2001) avaliaram, pelo AO, a qualidade da cromatina do sêmen congelado de touros e sua relação com a fertilidade a campo, através da taxa de não retorno ao cio aos 56 dias. Houve correlação negativa entre viabilidade espermática e cromatina anormal ($r = -0,71$; $p < 0,01$), e correlação negativa ($p < 0,05$) entre fertilidade a campo e a população de espermatozóides que fluoresceram em laranja, representada pelas células lesadas na avaliação pelo citômetro de fluxo ($r = -0,35$ a $-0,53$).

O AO vem sendo usado para testar a integridade do DNA, no entanto Eggert-Kruse *et al.* (1996), fazendo uso dessa coloração, fizeram avaliação de 103 amostras de sêmen humano encontrando baixo coeficiente de correlação ($r = 0,15$; $p < 0,05$) da morfologia normal com a percentagem de células que fluoresceram em verde. Não havendo diferença significativa entre o sêmen de pobre ou excelente qualidade, os autores, não recomendam o uso da coloração com AO na avaliação da qualidade e capacidade funcional do espermatozóide.

Mello (1982) avaliou o sêmen bovino com ATOL e observou que reprodutores de baixa fertilidade apresentaram os núcleos espermáticos 12 vezes mais metacromáticos quando comparados aos animais de alta fertilidade.

É fundamental destacar que diferentes técnicas são usadas para avaliar condensação e estabilidade da cromatina espermática. As colorações de Feulgen e ATOL são usadas na avaliação da condensação anormal da cromatina, pois permitem visualizar as fragmentações nucleares (Evenson *et al.*, 2002; Erenpreiss *et al.*, 2006). Os testes que incluem a *single cell gel electrophoresis assay* (COMET), *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling* (TUNEL) e AO são usados para identificar a estabilidade da estrutura da cromatina, ou seja, a suscetibilidade do DNA à desnaturação ácida ou pelo calor (Evenson *et al.*, 2002).

Alguns estudos vêm sendo feitos usando as avaliações da cromatina espermática feitas com AO e ATOL, abordando as vantagens e desvantagens de cada uma.

Beletti *et al.* (2004) destacam como desvantagem da coloração pelo AO o fato das amostras precisarem ser lidas rapidamente porque a emissão de fluorescência se dá por curto período de tempo. Já, as amostras coradas com ATOL podem ser lidas em microscópio ótico, sem o risco de alterar a coloração e com redução dos custos.

Machado *et al.* (2003) trabalhando com 15 reprodutores suínos, para avaliar a eficiência dos métodos da AO e do ATOL, no diagnóstico das alterações de compactação da cromatina, detectaram baixa correlação com as alterações morfológicas de cauda e cabeça. A média de células com anomalias na compactação da cromatina, detectada pelo método do ATOL, foi de $11,68 \pm 4,18$ e, pelo AO de $2,82 \pm 2,25$. Essa diferença foi significativa ($p < 0,05$) e mostra um desempenho melhor do método do azul de toluidina, que detecta a fragmentação nuclear, enquanto o AO avalia a estabilidade da cromatina.

Beletti e Mello (2004) usaram as técnicas de coloração por ATOL e Reagente de Feulgen na identificação da cromatina espermática alterada, utilizaram sêmen a fresco de coelhos. Apesar da dificuldade em diferenciar o

espermatozóide normal do anormal em algumas amostras, para ambos os testes, o ATOL fez melhor distinção entre as duas populações espermáticas.

Com o objetivo de verificar a eficácia das colorações pelo ATOL e AO na avaliação das anomalias no complexo DNA-proteína, Naves *et al.* (2004) em sêmen eqüino a fresco, verificaram que as colorações diferiram ($p < 0,05$) na identificação dos espermatozoides com lesão na cromatina (6,18% e 3,27%, ATOL e AO, respectivamente). Apesar dos baixos valores encontrados, sugerem o seu uso como técnicas complementares na avaliação seminal. A maior incidência de lesões, detectadas pelo ATOL, indica esta técnica como mais sensível na avaliação das fragmentações do complexo DNA-proteína.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction**, v.9, n.4, p. 331-345, 2003.
- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v. 14, n.6, p. 397-406, 1993.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p.145-174, 1987.
- ASBIA – Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Resultado da Comercialização de Doses em 2005. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br>>. Acesso em: 15 mai 2006.
- ANZAR, M.; GRAHAM, E.F.; IQBAL, N. Post-thaw plasma membrane integrity of bull spermatozoa separated with a sephadex ion-exchange column. **Theriogenology**, v. 47, p. 845-856, 1997.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. 1.ed. Iowa State University Press: Ames, 1989, 285p.
- BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v.62, p. 398-402, 2004.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A computational approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic & Histochemistry**, v.79, n.1, p. 17-23, 2004.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal Morphology Science**, v.22, n.2, p. 85-90, 2005a.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, v.85, p. 105-116, 2005b.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, v. 25, p. 383-391, 1973.

CASAGRANDE, J.F.; PINHEIRO, L.E.L.; ALMEIDA, C.A.; FERRAZ, J.B.S. Influência do número de espermatozoides, associado com os percentuais da patologia espermática classificada segundo Blom (1972) sobre a fertilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 4, n.º 3 e 4, p. 38-44, 1980a.

CASAGRANDE, J.F.; PINHEIRO, L.E.L.; ALMEIDA, C.A.; FERRAZ, J.B.S. A patologia espermática agrupada segundo Blom (1972) na avaliação de sêmen para congelamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 3, n.º 2, p. 19-23, 1980b.

CEPEA-USP/CNA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/pib>>. Acesso em: 30/10/2006.

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

CHRISTENSEN, P.; BOELLING, D.; PEDERSEN, K.M.; KORSGAARD, I.R.; JENSEN, J. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate of dairy bulls. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 1, p. 98-106, 2005.

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v. 42 p. 351-360, 1994.

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. 721-731, 1997.

DEN DAAS, J.H.G.; JONG, G.; LANSBERGEN, L.M.T.E.; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. **Journal Dairy Science**, v. 81, p. 1714-1723, 1998.

DUCCI, M.; GAZZANO, A.; VILLANI, C.; CELA, V.; ARTINI, P.G.; MARTELLI, F.; GENAZZANI, A.R. Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 102, p. 53-56, 2002.

EGGERT-KRUSE, W.; ROHR, G.; KERBEL, H.; SCHWALBACH, B.; DEMIRAKCA, T.; KLINGA, K.; TILGEN, W.; RUNNEBAUM, B. The acridine orange test: a clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation? **Human Reproduction**, v. 11, n. 4, p. 784-789, 1996.

ELLINGTON, J.E.; EVENSON, D.P.; FLEMING, J.E.; BRISBOIS, R.S.; HISS, G.A.; BRODER, S.J.; WRIGHT, R.W.Jr. Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 4, p. 643-649, 1998.

ERENPREISS, J.; SPANO, M.; ERENPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWERCMAN, A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal Andrology**, v. 8, p. 11-29, 2006.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p.1131-1133, 1980.

EVENSON, D.P.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods in Cell Science**, v. 22, p. 169-189, 2000.

EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 1, p.25-43, 2002.

FOOTE, R.H.; KAPROTH, M.T. Sperm numbers inseminated in dairy cattle and nonreturn rates revisited. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 3072-3076, 1997.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinarian Clinic North American**, v. 12, n. 1, p. 131-147, 1996.

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

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Editora Manole, 2004, 512p.

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. 73-86, 1990.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Produção da Pecuária Municipal – PPM. Brasil, v.32, 35p., 2004.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Relationship between sperm response to glycosaminoglycans in vitro and non-

return rates of Swedish dairy AI bulls. **Reproduction Domestic Animal**, v. 35, p. 207-212, 2000.

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

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

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

LIU, Z.; FOOTE, R.H. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. **Journal Dairy Science**, v. 81, p. 1868-1873, 1998.

LOPES, S.; JURISICOVA, A.; SUN, J.G.; CASPER, R.F. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.13, n.4, p.896-900, 1998.

LOVE, C.C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 39-45, 2005.

MACHADO, E.R.; KAMIMURA, C.F.; BELETTI, M.E.; JACOMINI, J.O. Diagnóstico de alterações na compactação da cromatina em espermatozoides de suíno através de azul de toluidina e alaranjado de acridina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p. 381-382, 2003.

MADRID-BURY, N.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, F.; PÉREZ-GARNELO, S.; MOREIRA, P.; SANJUANBENITO, B.P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MARTÍNEZ, J.F. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, p. 232-241, 2005.

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

MELLO, M.L.S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v.74, p. 387-392, 1982.

- MELLO, M.L.S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. **Brazilian Journal Genetics**, v. 20, p. 257-264, 1997.
- MEYERS, S.A. Spermatozoal response to osmotic stress. **Animal Reproduction Science**, v.89, p. 57-64, 2005.
- NAVES, C.S.; BELETTI, M.E.; DUARTE, M.B.; VIEIRA, R.C.; DINIZ, E.G.; JACOMINI, J.O. Avaliação da cromatina espermática em eqüinos com azul de toluidina e acridine orange. **Bioscience Journal**, v.20, n.3, p. 117-124, 2004.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia – GO: Editora Colégio Brasileiro de Reprodução, 2005, CD-ROM.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment? **Reproduction Domestic Animal**, v.41, suppl. 2, p.2-10, 2006.
- ROTA, A.; PENZO, N.; VICENTI, L.; MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay of testing *in vitro* fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1415-1420, 2000.
- SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, p. 175-731, 1972.
- 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.
- TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, v. 42, n.1, p. 87-91, 1984.
- THUNDANTHIL, J.; PALASZ, A.T.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. Fertilization characteristics and *in vitro* embryo production with bovine sperm containing multiple nuclear vacuoles. **Molecular Reproduction Development**, v.50, p. 328-333, 1998.
- THUNDANTHIL, J.; PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J.; BARTH, A.D. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 57, p. 35-50, 1999.

THUNDANTHIL, J.; PALOMINO, J.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J.; BARROS, C. Fertilizing characteristics of bovine sperm with flattened or indented acrosomes. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 231-243, 2001.

THUNDANTHIL, J.; PALASZ, A.T.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. **Theriogenology**, v. 58, p. 87-102, 2002.

UNANIAN, M.M. **Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 21p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 56).

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

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

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. **International Journal of Andrology**, v. 21, p. 207-216, 1998.

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA E CROMATINA NO SÊMEN BOVINO CONGELADO

Assessment of sperm plasma membrane and chromatin integrity in frozen-thawed bull semen

RESUMO

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar se testes laboratoriais, usados na identificação das lesões estruturais e funcionais da membrana plasmática e da integridade da cromatina, são efetivos para explicar as variações na taxa de gestação em programas de inseminação artificial. Foram usados os dados de campo da inseminação artificial de 2.036 fêmeas da raça Nelore, com sêmen de 22 touros da mesma raça. Avaliou-se a integridade funcional da membrana plasmática por meio do teste hiposmótico, a integridade estrutural da membrana plasmática pela coloração com eosina/nigrosina e da cromatina espermática por intermédio da sonda fluorescente *acridine orange* e do corante azul de toluidina. Houve efeito significativo ($p < 0,0001$) da estação de monta, touro e inseminador sobre a taxa de gestação, variáveis essas, que não foram controladas. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupamentos de touros quanto a percentagem de espermatozoides com cromatina lesada detectados pelo azul de toluidina ou *acridine orange*. Em função das avaliações seminais, quando consideradas isoladamente, a taxa de gestação não variou. A concentração da dose inseminante, motilidade, integridade estrutural e funcional da membrana plasmática e lesões na cromatina foram variáveis espermáticas importantes que individualmente não apresentaram correlação com a fertilidade *in vivo*, contudo as combinações entre elas explicaram cerca de 80% da variação na taxa de gestação, podendo ser usadas para avaliar a qualidade seminal de touros.

Palavras-chave: *acridine orange*, azul de toluidina, fertilidade, teste hiposmótico, touro

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate whether laboratorial tests used in the identification of structural and functional sperm membrane damages and chromatin integrity, are effective to explain the variations in fertilization rate in programs of artificial insemination. Data from 2036 Nelore cows artificial inseminated with 22 different Nelore bulls were used. The sperm membrane functional integrity was evaluated with the hypoosmotic swelling test (HOST),

and chromatin integrity with the fluorescent probe acridine orange and toluidine blue stain. Sperm concentration, motility, HOST and acridine orange accounted for 80% of variation in the fertilization rate. The laboratorial tests did not explain all fertility rate differences, however, there was significant on pregnancy rate ($p < 0.0001$) effect of season breeding, bull and technician. These were not controlled in the present. The number of sperm with chromatin damage detected by acridine orange or toluidine blue stain were not different ($p > 0.05$) among the bull groups. The concentration of the number of spermatozoa per insemination, motility, the functional integrity of plasma membrane and damage in the chromatin were important semen quality characteristics, that individually without correlation of with the fertility in vivo, although the combinations between these explained 80% of the variation in the fertilization rate, and they can be used to evaluate of the semen quality of bulls.

Keywords: acridine orange, bull, fertility, hypoosmotic swelling test, toluidine blue.

INTRODUÇÃO

A fertilidade do touro tem grande impacto no desempenho reprodutivo do rebanho, principalmente com o uso de biotecnologias como a inseminação artificial (IA), que permite disponibilizar grande quantidade de material genético em curto espaço de tempo.

O processo de criopreservação, com o objetivo de conservar a capacidade fecundante do espermatozóide, tem contribuído para o incremento da produção bovina, pois a congelação leva a célula à redução do seu metabolismo proporcionando a diminuição dos gastos energéticos e da produção de catabólitos (Watson, 1995; Watson, 2000). No entanto, existe uma diversidade de atributos funcionais e estruturais que precisam ser mantidos pós-descongelação, para o sucesso da fecundação (Amann e Hammerstedt, 1993).

Avaliações seminais de rotina incluem a determinação do volume, aspecto, concentração, morfologia e motilidade espermáticas, porém esses atributos são insuficientes para estimar o potencial fecundante de um reprodutor e identificar os animais subférteis (Rodriguez-Martinez, 2005). As avaliações da motilidade

e da morfologia são úteis, apesar dos estudos mostrarem correlações variáveis entre motilidade e fertilidade (Correa *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Januskauskas *et al.*, 2001), enquanto as anormalidades morfológicas são importantes responsáveis pela redução da fertilidade (Thundathil *et al.*, 1999; Thundathil *et al.*, 2001; Beletti e Mello, 2004). Diante disso, estudos têm sido desenvolvidos na busca da melhor associação entre testes estruturais e funcionais, para estimar a integridade das células espermáticas e que se correlacionem com as taxas de prenhez.

Pesquisadores têm mostrado que para estimar a fertilidade potencial de um reprodutor, além das análises de motilidade e morfologia, podem ser associadas avaliações da integridade funcional e estrutural da membrana plasmática, pelo teste hiposmótico e eosina/nigrosina (Jeyendran *et al.*, 1984; Correa e Zavos, 1994; Correa *et al.*, 1997; Tartaglione e Ritta, 2004) e da integridade estrutural da cromatina espermática (Evenson *et al.*, 1980; Tejada *et al.*, 1984; Unanian, 2000) com sondas fluorescentes como *acridine orange* (AO), ou corantes como o azul de toluidina (Mello, 1982; Beletti e Mello, 1996; Beletti e Mello, 2004; Naves *et al.*, 2004).

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar se testes laboratoriais, usados na identificação das lesões estruturais e funcionais da membrana plasmática e integridade da cromatina, são efetivos para explicar as variações na taxa de gestação em programas de inseminação artificial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletados dados de campo da inseminação artificial de 2.036 fêmeas da raça Nelore, pertencentes a diferentes categorias reprodutivas. Dessas matrizes 1.326 pertenciam a **Fazenda 1** (22°47'21,96"S e 54°35'53,05"O), localizada no município de Juti-MS e, 710 a **Fazenda 2** (19°55'30,63"S e 55°40'20,89"O), em Aquidauana-MS. As fêmeas foram inseminadas com sêmen congelado de 22 touros nelore provenientes de cinco centrais de IA (Tab. 1), tendo sido usada uma dose/fêmea e consideradas no mínimo 27

fêmeas/touro. As inseminações foram feitas em três estações de monta (EM), sendo na **Fazenda 1** as EM 2002/2003, 2003/2004 e 2004/2005 e, na **Fazenda 2** EM 2003/2004, 2004/2005 e 2006.

Tabela 1. Distribuição de inseminadores, touros e fêmeas de diferentes categorias reprodutivas submetidas à inseminação artificial nas fazendas 1 e 2

	Fazenda 1	Fazenda 2	Total
Inseminadores	7	2	9
Touros	12	10	22
Fêmeas	1.326	710	2.036
Nulíparas	378	28	406
Primíparas	58	198	256
Pluríparas	890	484	1.374

A taxa de gestação foi usada como índice para aferir a fertilidade a campo do rebanho, obtida por exame ginecológico, via palpação retal.

Análise física e morfológica do sêmen

Amostras de sêmen da partida usada na IA foram submetidas às avaliações física e morfológica, após a descongelação das palhetas em banho-maria a 37°C por 30 segundos.

Avaliou-se a motilidade espermática depositando uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, aquecidas a 37°C. A avaliação subjetiva foi feita sob microscopia de contraste de fase, com objetiva de 40X. O resultado foi expresso em percentagem conforme a proporção total de espermatozóides móveis (CBRA, 1998).

Procedeu-se a diluição do sêmen em solução de formol-salina-tamponada na proporção de 1:20, sendo a amostra homogeneizada e depositada em Câmara de Neubauer, realizando-se a contagem dos espermatozóides em microscopia de campo claro, com objetiva de 40X, e o resultado expresso em número de espermatozóides ($\times 10^6$) por dose.

As amostras de sêmen foram conservadas em solução de formol-salina-tamponada e avaliadas 100 células/ lâmina (Salisbury e Mercier, 1945) em preparações úmidas, sob microscopia de contraste de fase, com aumento de 1.000X, realizadas no Laboratório de Reprodução Animal/FAMEZ, UFMS. De

acordo com a classificação das patologias, proposta por Blom (1973) citado por Barth e Oko (1989), se fez a análise morfológica e os resultados foram expressos em percentagem de normais.

Análise da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática

A avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática foi feita em esfregaço de sêmen corado com eosina/nigrosina conforme proposto por Hancock e modificado por Barth e Oko (1989). A classificação em vivos e mortos é possível uma vez que, a eosina penetra no espermatozóide quando a membrana plasmática está rompida. Corando-se em rosa indica que a célula está morta, e a nigrosina, por tornar o fundo escuro, permite a detecção do espermatozóide vivo, não corado. A avaliação foi feita pós-descongelamento, sendo usada a proporção de 1:1, ou seja, 10µL de sêmen e 10µL do corante.

O teste hiposmótico usado foi desenvolvido por Jeyendran *et al.* (1984) e validado por Correa e Zavos (1994) para a avaliação do sêmen bovino congelado, sendo a solução hiposmótica composta por 7,35g/L de citrato de sódio e 13,51g/L de frutose, e osmolaridade final ajustada para 100 mOsm/L. O sêmen foi lavado duas vezes em solução salina (0,9% NaCl), a 700G/10 minutos, para a retirada do glicerol e, posteriormente, acrescidos 100µL de sêmen à 1.000µL da solução hiposmótica, para incubação em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Os espermatozóides foram avaliados com objetiva de 40X e aqueles que apresentaram enrolamento da cauda foram classificados como responsivos, indicando uma membrana plasmática intacta e bioquimicamente ativa.

Análise da integridade estrutural da cromatina espermática

Foram usadas duas técnicas para a avaliação da cromatina: azul de toluidina (ATOL) e *acridine orange* (AO). Para ATOL foram feitos dois esfregaços de sêmen, pós-descongelamento, por touro. Após serem secos a temperatura

ambiente, foram fixados em solução de etanol:ácido acético (3:1) por um minuto, depois em etanol 70% por três minutos, hidrolisados por 20 minutos em ácido clorídrico 4 mMol, em seguida lavados com água destilada e secos a temperatura ambiente (Beletti *et al.*, 2004).

O esfregaço foi corado por meio da adição de 20µL da solução de azul de toluidina 0,025% (em tampão de McIlvaine, pH 4,0) entre lâmina e lamínula. A leitura foi feita em microscópio ótico, em aumento de 1.250X, sendo que as células normais coraram em azul claro, enquanto aquelas com alteração na condensação da cromatina, em azul escuro a violeta (Beletti *et al.*, 2004).

A técnica de coloração com AO foi feita de acordo com o proposto por Tejada *et al.* (1984). Após a lavagem do sêmen em solução salina, os esfregaços foram preparados e secos a temperatura ambiente, fixados *overnight* em metanol e ácido acético, (3:1; solução de Carnoy), lavados e secos a temperatura ambiente, sendo corados com solução de AO (1mg/mL) por cinco minutos, lavados com água destilada e, antes de secarem, recobertos com lamínula e, então feita à leitura sob microscopia de epifluorescência, em aumento de 40X.

Para analisar possíveis diferenças entre lâminas e/ou técnicos nas leituras, os esfregaços foram confeccionados em duplicata por touro, avaliados por dois técnicos, sendo a contagem total de 200 células/avaliador/touro nas análises com EN e HOS. Da mesma forma, foram preparadas as amostras para as técnicas com ATOL e AO, contadas 500 células/avaliador/touro e, as avaliações com AO feitas por um único técnico.

Análise estatística

Utilizou-se o teste do Qui-quadrado para verificar os efeitos de fazenda, inseminador, estação de monta (EM), touro, central de processamento de sêmen (central) e categoria de vaca (CAT), sobre a taxa de gestação (TG).

Considerando a fórmula de Yule para cálculo de número de classes (Sampaio, 1998), e ponderando a viabilidade econômica dos resultados de programas de

inseminação artificial, conforme a avaliação de Fonseca (1991), os touros foram agrupados em três classes de taxa de gestação (cITG):

- 1) Classe 1: taxa de gestação menor ou igual a 52%;
- 2) Classe 2: taxa de gestação maior que 52% e menor e/ou igual a 66,7%;
- 3) Classe 3: taxa de gestação maior que 66,7%.

Foi aplicado o teste de Duncan para comparar as médias das avaliações funcional e estrutural da membrana plasmática e da cromatina, entre as diferentes classes de taxa de gestação.

O teste *t de Student*, com confiabilidade de 95%, foi utilizado para identificar se houve diferença significativa nas leituras das lâminas por diferentes técnicos, para as avaliações da integridade estrutural (EN), funcional (HOS) e da cromatina (ATOL e AO).

Para análise da associação entre as variáveis laboratoriais e a taxa de gestação foram estimados os coeficientes de correlação de *Pearson* entre as variáveis utilizando o procedimento PROC CORR do SAS (1995).

As variáveis laboratoriais foram submetidas à análise multivariada de componentes principais pelo procedimento, PROC PRINCOMP do Pacote Estatístico do SAS (1995).

Considerando que a eosina/nigrosina e o teste hiposmótico avaliam a integridade da membrana plasmática e, o azul de toluidina e o *acridine orange* a integridade da cromatina, os testes foram agrupados em quatro modelos, sendo comum a todos a motilidade, concentração espermática e percentagem de normais, sendo incluídos em cada modelo:

- 1) modelo 1: percentagem de vivos na eosina/nigrosina (ENV) e ATOL;
- 2) modelo 2: ENV e AO;
- 3) modelo 3: percentagem de reativos ao teste hiposmótico (HOSCE) e ATOL;
- 4) modelo 4: HOSCE e AO.

RESULTADOS

O teste do Qui-quadrado permitiu verificar que a taxa de gestação variou significativamente ($p < 0,0001$) em função de: estação de monta ($\chi^2 = 30,68$; $p < 0,0001$), touro ($\chi^2 = 77,61$; $p < 0,0001$), central ($\chi^2 = 37,18$; $p < 0,0001$) e inseminador ($\chi^2 = 40,35$; $p < 0,0001$). Já, a categoria das matrizes ($\chi^2 = 2,88$; $p = 0,24$) e a fazenda ($\chi^2 = 3,15$; $p = 0,08$) não tiveram influência sobre a taxa de gestação. As variáveis de campo que não foram controladas e que exerceram efeito sobre a taxa de gestação como inseminador, touro, estação de monta, provavelmente contribuíram para as diferenças observadas.

A taxa de gestação média para as 2.036 fêmeas inseminadas foi 63,8%, sendo de 61,5% para a **Fazenda 1** e 67,2% para a **Fazenda 2**, não havendo diferença significativa ($p = 0,08$) entre fazendas.

As características espermáticas de motilidade pós-descongelamento ($61,5 \pm 6,9$; $60,0 \pm 8,7$), concentração ($35,5 \pm 25,2$; $23,2 \pm 6,7$) e percentual de morfologicamente normais ($85,8 \pm 5,4$; $86,0 \pm 4,6$) não diferiram significativamente entre as fazendas 1 e 2, respectivamente, mostrando a uniformidade seminal das doses empregadas em cada fazenda.

A avaliação estrutural e funcional da membrana plasmática dos espermatozoides foi realizada em duplicata por dois técnicos, nos momentos pós-descongelamento, usando o corante eosina/nigrosina e, após a incubação em solução hiposmótica, não havendo diferença ($p > 0,05$) entre lâminas e entre técnicos. Dessa forma, constatou-se a estabilidade dos resultados para ambas as técnicas.

Na tabela 2 pode-se observar que as classes de taxa de gestação não diferiram entre si nas avaliações funcional e estrutural da membrana plasmática feitas com o corante eosina/nigrosina e o teste hiposmótico, da mesma forma que não houve diferença significativa nas avaliações da cromatina usando o *acridine orange* e o azul de toluidina.

Tabela 2. Avaliações funcional e estrutural da membrana plasmática e cromatina do sêmen congelado (média \pm desvio padrão) de 22 touros agrupados em três classes de taxa de gestação (1= $\leq 52\%$; 2= >52 a $<66,7\%$; 3= $\geq 66,7\%$)

<i>Variáveis (%)*</i>	<i>Classes de taxa de gestação</i>			<i>Total (n=22)</i>
	<i>1 (n=5)</i>	<i>2 (n=6)</i>	<i>3 (n=11)</i>	
Taxa de gestação	47,7 \pm 3,1 ^c	63,1 \pm 2,4 ^b	71,7 \pm 5,4 ^a	63,8 \pm 10,6
Motilidade (%)	62,0 \pm 8,4 ^{ab}	55,0 \pm 5,5 ^b	63,6 \pm 6,7 ^a	60,9 \pm 7,5
Concentração ($\times 10^6$ /dose)	54,3 \pm 31,5 ^a	21,5 \pm 12,4 ^b	24,5 \pm 5,9 ^b	30,4 \pm 20,5
Morfologia - % normais	85,6 \pm 4,3 ^a	85,7 \pm 7,3 ^a	86,1 \pm 4,2 ^a	85,9 \pm 5,0
EN - vivos	61,3 \pm 7,3 ^a	63,4 \pm 10,8 ^a	65,8 \pm 13,4 ^a	64,1 \pm 11,3
HOSTCE	33,7 \pm 11,5 ^a	34,8 \pm 10,3 ^a	34,7 \pm 9,0 ^a	34,5 \pm 9,5
AO – lesados	8,1 \pm 5,6 ^a	8,5 \pm 4,8 ^a	5,2 \pm 4,5 ^a	6,8 \pm 4,8
ATOL – lesados	3,4 \pm 1,6 ^a	4,4 \pm 2,7 ^a	3,8 \pm 1,7 ^a	3,9 \pm 1,9

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre médias pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

EN: eosina/nigrosina

HOSTCE: espermatozóides com cauda enrolada ao teste hiposmótico

AO: acridine orange

ATOL: azul de toluidina

Considerando que não houve um critério definido e completo em termos de delineamento experimental, optou-se pela análise de componentes principais. Na Tab. 3 são apresentadas, para os diferentes modelos, as correlações significativas entre as variáveis seminais, as percentagens de variância explicada e acumulada, dos dois primeiros componentes principais, que explicaram grande parte da variação na taxa de prenhez.

Tabela 3. Correlações entre as variáveis seminais, % de variância explicada e acumulada, nos diferentes modelos, para os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2)

Modelos	Variáveis	Coeficiente Correlação Pearson (p)	
		CP1	CP2
1	Motilidade	n.s.*	0,57 (p=0,005)
	Concentração	0,99 (p<0,0001)	n.s.
	Morfologia - % normais	n.s.	n.s.
	Eosina/nigrosina - % vivos	n.s.	0,94 (p<0,0001)
	Azul de toluidina – % lesados	n.s.	n.s.
	<i>% variância explicada</i>	0,63	0,19
	<i>% variância acumulada</i>		0,82
2	Motilidade	n.s.	0,58 (p=0,005)
	Concentração	0,99 (p<0,0001)	n.s.
	Morfologia - % normais	n.s.	n.s.
	Eosina/nigrosina - % vivos	n.s.	0,94 (p<0,0001)
	<i>Acridine orange</i> – % lesados	n.s.	n.s.
	<i>% variância explicada</i>	0,61	0,19
	<i>% variância acumulada</i>		0,80
3	Motilidade	n.s.	0,44 (p=0,04)
	Concentração	0,99 (p<0,0001)	n.s.
	Morfologia - % normais	n.s.	n.s.
	Hiposmótico - % vivos	n.s.	0,96 (p<0,0001)
	Azul toluidina – % lesados	n.s.	n.s.
	<i>% variância explicada</i>	0,66	0,15
	<i>% variância acumulada</i>		0,81
4	Motilidade	n.s.	n.s.
	Concentração	0,99 (p<0,0001)	n.s.
	Morfologia - % normais	n.s.	n.s.
	Hiposmótico - % vivos	n.s.	0,96 (p<0,0001)
	<i>Acridine orange</i> – % lesados	n.s.	0,46 (p=0,03)
	<i>% variância explicada</i>	0,65	0,15
	<i>% variância acumulada</i>		0,80

*n.s. = não significativa

DISCUSSÃO

As pesquisas têm mostrado que entre os fatores que influenciam a taxa de gestação pode estar o efeito de inseminador, como observado neste estudo em que as taxas de gestação variaram significativamente, de 47,7% a 71,7%, entre os inseminadores. Esse efeito de inseminador sobre a taxa de gestação,

tem sido relatado por outros pesquisadores como Reurink et al. (1990); Mizuta e Madureira (1999) e; Costa e Silva et al. (2005).

Outro fator que pode influenciar a taxa de gestação é o efeito de touro, como encontrado neste estudo. Isso talvez se justifique, de acordo com den Daas (1992), pelo fato do número ótimo de espermatozoides por inseminação variar entre touros e não estar relacionado com a taxa de gestação obtida, pois existem outros fatores que influenciam o sucesso da gestação. Uma dose com baixo número de espermatozoides se torna importante quando a fertilidade do touro é baixa ou o sêmen é usado por inseminadores menos eficientes (Foote e Kaproth, 1997).

Diferente dos resultados desta pesquisa, em que houve efeito de touro sobre a taxa de gestação, outros autores não encontraram esse efeito, como no trabalho de Zhang et al. (1999), para 12 touros usados em 8.620 inseminações em que a taxa de gestação variou entre 61 e 66%.

O efeito de central sobre a taxa de gestação encontrado neste experimento se deveu a uma central que apresentou uma taxa média de gestação de 48,7%, resultado este inferior ao das demais centrais (66,9%, 69,4%, 59,9% e 61,5%).

As amostras de sêmen foram avaliadas quanto às características físicas e morfológicas e, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as três classes de taxa de gestação. De acordo com o CBRA (1998), para sêmen congelado de touros, a motilidade pós-descongelação deve ser superior a 30%, os defeitos maiores inferiores a 20% e os defeitos totais não superiores a 30%. Neste trabalho os valores percentuais médios encontrados para motilidade ($60,9 \pm 7,5$) e morfologia ($85,9 \pm 5,0$) atendem ao preconizado pelo CBRA (1998) e estão de acordo com o que vem sendo encontrado por outros pesquisadores para a espécie (Correa e Zavos, 1994; Tartaglione e Ritta, 2004).

Dentre os atributos necessários para a fecundação está a motilidade, fundamental para que o espermatozoide percorra o trato reprodutivo feminino até sua ligação com o ovócito. Apesar de significativa, as correlações entre motilidade e fertilidade têm mostrado variação de 0,15 – 0,83 entre os estudos

(Zhang et al., 1998; Januskaukas et al., 2000; Rodriguez-Martinez, 2005). No entanto, motilidade e morfologia continuam sendo as características seminais mais usadas para estimar a fertilidade.

Os valores de motilidade ($60,9 \pm 7,5\%$) e a variação da taxa de gestação ($47,7 \pm 3,1 - 71,7 \pm 5,4\%$), observadas neste experimento, foram similares aos encontrados por Hallap et al. (2006), trabalhando com sêmen congelado de seis touros da raça Estonian Holstein ($63,0 \pm 1,9; 52,2 - 76\%$, respectivamente). Da mesma forma, os autores não obtiveram correlação entre os dados laboratoriais e a fertilidade nas avaliações pós-descongelamento, o que se explica pelo fato de se trabalhar com touros de uma população homogênea, como foi o caso dos reprodutores avaliados neste experimento.

De acordo com den Daas (1992) a relação entre características seminais avaliadas em laboratório e a fertilidade tem sido inconsistente, em decorrência do número definido de espermatozoides por inseminação, às vezes tão elevado que reduz as chances da população espermática com alterações, influenciar os resultados de fertilidade. Neste experimento o número de células espermáticas por dose ($30,4 \pm 20,5 \times 10^6$) foi superior ao recomendado por Vale Filho (1989) para a obtenção de índices satisfatórios de fecundação (15 a 25×10^6) e, ao mínimo de 10×10^6 espermatozoides viáveis preconizado pelo CBRA (1998) para sêmen bovino congelado.

A membrana plasmática tem a função de permitir o transporte seletivo de moléculas através da célula, sendo sua integridade importante para que ocorram as reações necessárias à união dos gametas masculino e feminino (Jeyendran et al., 1984). O processo de criopreservação pode levar ao rompimento da membrana, comprometendo a viabilidade da célula, por isso tem-se buscado, através de testes laboratoriais, avaliar a integridade da membrana e correlacioná-la com a fertilidade (Watson, 1995; Graham e Mocé, 2005). Neste trabalho não houve correlação entre percentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HOS) e a fertilidade a campo, diferindo do que foi encontrado por outros pesquisadores trabalhando com sêmen bovino congelado (Rota et al., 2000; Tartaglione e Ritta, 2004) na produção *in vitro* de embriões. É possível que essas diferenças se devam ao

fato dos resultados obtidos pelos autores serem correlacionados com fertilidade *in vitro*, situação em que há um maior controle das variáveis que podem interferir nos resultados de fertilidade.

O percentual médio de gametas com cauda enrolada ($34,5 \pm 9,5$) foi inferior aos encontrados na literatura para sêmen bovino congelado, $48 \pm 4,7$ (Correa e Zavos, 1994), $43,8 \pm 13,4$ (Rota et al., 2000) e $58,8 \pm 2,6$ (Tartaglione e Ritta, 2004). Essa menor resposta ao HOS pode ser devida a danos causados durante o processo de congelação e descongelação, e/ou daqueles decorrentes das condições de estoque e manuseio, como sugere Siqueira et al. (2007) que obtiveram para o sêmen congelado de 13 touros, um percentual de $37,9 \pm 7,9$ de espermatozóides responsivos ao HOS.

Neste estudo, não houve correlação significativa ($p=0,51$) entre o percentual de espermatozóides responsivos ao HOS ($34,5 \pm 9,5$) e aqueles com membrana intacta identificados pela EN ($64,1 \pm 11,3$). Lin et al. (1998), trabalhando com sêmen humano, não encontraram correlação entre os resultados do HOS e àqueles do corante vital. Brito et al. (2003) ao associarem um corante vital ao HOS observaram, em bovinos, correlação moderada entre os espermatozóides vivos e os responsivos ($r=0,55$; $p<0,01$), indicando que isoladamente o corante vital, apesar de útil para identificar a integridade estrutural da membrana, não é suficiente para avaliar sua função.

Foi possível observar neste trabalho que o percentual de vivos, identificados pela EN, foi maior que o de responsivos ao HOS. Resultado similar já foi relatado por outros autores que sugerem que a resposta ao HOS depende da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática, para manter o metabolismo espermático e ser capaz de sofrer as reações necessárias para a fertilização do ovócito (Brito et al., 2003).

Durante a espermiogênese as espermátides sofrem uma série de modificações morfológicas, e ocorre a substituição das histonas pelas protaminas, para que haja a compactação da cromatina e, assim, confira estabilidade ao núcleo espermático. No entanto, alterações na estrutura da cromatina podem levar a alterações morfológicas. Neste estudo não se observou correlação significativa

entre lesão da cromatina, detectada tanto pelo AO como pelo ATOL, e a morfologia espermática. Dado semelhante já foi relatado por outros pesquisadores, que atribuem esse resultado ao fato das alterações na cromatina não serem necessariamente acompanhadas por alterações morfológicas (Beletti et al., 2005).

A associação entre estrutura da cromatina, avaliada pelo AO, e fertilidade, tem apresentado resultados discrepantes entre pesquisadores. No presente estudo não se observou correlação significativa ($p=0,20$) entre os dados do AO e a fertilidade a campo. Martins et al. (2007) compararam a avaliação feita com *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling* (TUNEL) e com AO, e sugerem que este talvez tenha subestimado o percentual de lesões. Eggert-Kruse et al. (1996), trabalhando com sêmen humano, encontraram um baixo coeficiente de correlação entre o AO e a fertilidade ($r=0,15$; $p<0,05$), não recomendando este teste para avaliação da qualidade espermática, pois não houve diferença significativa entre os resultados de AO para o sêmen de pobre ou excelente qualidade.

Contrapondo ao encontrado nesta pesquisa e ao relatado pelos autores já citados, outros pesquisadores observaram correlação positiva e significativa entre o AO e a fertilidade (Evenson et al., 1980; Januskauskas et al., 2001).

Madrid-Bury et al. (2005) trabalhando com sêmen bovino, mesmo usando uma metodologia diferente da empregada neste trabalho encontraram correlação ($r=0,66$; $p<0,001$) entre estabilidade, que pode ser avaliada com AO, e fertilidade e, sugerem que a baixa estabilidade da cromatina pode estar relacionada a baixa fertilidade intrínseca ou a uma maior suscetibilidade ao processo de congelamento, podendo, portanto, essa avaliação ser uma ferramenta complementar ao exame de rotina do sêmen.

As diferenças entre os resultados da avaliação feita com AO podem ser atribuídas à sensibilidade na leitura e interpretação dos resultados, uma vez que a leitura deve ser rápida, pois a emissão da fluorescência se dá por curto período, decrescendo após 40 segundos e, também devido à heterogeneidade no padrão de coloração das lâminas (Duran et al., 1998; Beletti et al., 2004).

Neste trabalho foram usadas duas técnicas para avaliar a integridade da cromatina, sendo os resultados obtidos na coloração com ATOL, inferiores àqueles com AO. Esse resultado talvez seja explicado pelo fato das técnicas fazerem avaliações distintas, pois o ATOL permite avaliar a condensação anormal e esta, possivelmente, predispõe a fragmentação nuclear e, quando a amostra é submetida a desnaturação ácida, no protocolo do AO, detecta maior percentual de alterações na estabilidade da cromatina. Embora a literatura mostre resultados diferentes para outras espécies, como em suínos (ATOL = 11,68% e AO = 2,82%; $p < 0,05$) por Machado et al. (2003) e, em eqüinos (ATOL = 6,18% e AO = 3,27%; $p < 0,05$) por Naves et al. (2004), os autores não citam as prováveis razões para as diferenças observadas entre as técnicas.

Cada componente principal (CP) é uma combinação linear das variáveis originais, mas diferentemente destas, os componentes são independentes entre si e estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos de variação total da amostra (Cruz e Regazzi, 2001). No presente estudo, considerando as variáveis seminais, cerca de 80% da variação da taxa de gestação foi explicada por dois componentes principais, formados pelos resultados da concentração espermática, da motilidade, da eosina/nigrosina, do teste hiposmótico e do AO. Diante disso é possível recomendar o uso destas análises como testes complementares na avaliação das características seminais, para estimar o potencial reprodutivo do touro.

CONCLUSÕES

A concentração da dose inseminante, motilidade, integridade estrutural e funcional da membrana plasmática e lesões na cromatina foram variáveis espermáticas importantes que individualmente não apresentaram correlação com a fertilidade *in vivo*, contudo as combinações entre elas explicaram cerca de 80% da variação na taxa de gestação, podendo ser usadas para avaliar a qualidade seminal de touros.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT R.H. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v. 14, n.6, p. 397-406, 1993.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. 1.ed. Iowa State University Press: Ames, 1989, 285p.
- BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v.62, p. 398-402, 2004.
- BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Methodology: Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, n. 1, p. 97-103, 1996.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal Morphology Science**, v.22, n.2, p. 85-90, 2005.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A computational approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic & Histochemistry**, v.79, n.1, p. 17-23, 2004.
- BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU-GOESEELS, S. 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.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, 2.ed., 65 p., 1998. (Elaborado conforme convênio CBRA/MA n. 021/1997).
- CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v. 42 p. 351-360, 1994.
- 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. 721-731, 1997.

COSTA E SILVA, E.V.; RUSSI, L.S.; RUEDA, P.M. et al. Interação homem-animal e a fertilidade nos programas de inseminação artificial em tempo fixo de bovinos de corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005. Goiânia, **Anais...** Goiânia, 2005b, CD-ROM.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed.rev. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001, 390p.

DEN DAAS, N. Laboratory assessment of semen characteristics. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 87-94, 1992.

DURAN, E.H.; GÜRGAN, T.; GÜNALP, S. et al. A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization *in vitro*. **Human Reproduction**, v.13, n. 5, p. 1235-1239, 1998.

EGGERT-KRUSE, W.; ROHR, G.; KERBEL, H. et al. The acridine orange test: a clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation? **Human Reproduction**, v. 11, n. 4, p. 784-789, 1996.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p.1131-1133, 1980.

FOOTE, R.H.; KAPROTH, M.T. Sperm numbers inseminated in dairy cattle and nonreturn rates revisited. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 3072-3076, 1997.

FONSECA, V.O. Redução do período de serviço em vacas de corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2, 1991. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. v.2, p. 1-21, 1991.

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

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U. et al. Usefulness of a triple fluorochrome combination mrocyanine 540/yo-pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-tawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v. 65, p. 1122-1136, 2006.

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

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 Domestic Animal**, v. 35, p. 207-212, 2000.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984.

LIN, M.; MORSHEDI, M.; SRISOMBUT, C. et al. Plasma membrane integrity of cryopreservation human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test and eosin-Y staining. **Fertility and Sterility**, v. 70, n. 6, p. 1148-1155, 1998.

MACHADO, E.R.; KAMIMURA, C.F.; BELETTI, M.E. et al. Diagnóstico de alterações na compactação da cromatina em espermatozoides de suíno através de azul de toluidina e alaranjado de acridina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p. 381-382, 2003.

MADRID-BURY, N.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, F.; PÉREZ-GARNELO, S. et al. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, p. 232-241, 2005.

MARTINS, C.F.; DODE, M.N.; BAÓ, S.N. et al. The use of acridine orange test and TUNEL assay to assess DNA integrity of bovine freeze-dried spermatozoa. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 1, p. 94-104, 2007.

MELLO, M.L.S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v.74, p. 387-392, 1982.

MIZUTA K.; MADUREIRA E.H. Sincronização do estro em fêmeas bovinas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) com o uso de acetato de melegestrol associado ou não à prostaglandina F₂α. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 5, p.1-11, 1999.

NAVES, C.S.; BELETTI, M.E.; DUARTE, M.B. et al. Avaliação da cromatina espermática em eqüinos com azul de toluidina e acridine orange. **Bioscience Journal**, v.20, n.3, p. 117-124, 2004.

REURINK, A.; DEN DAAS, J.H.G.; WILMINK, J.B.M. Effects of AI sires and technician on non-return rates in the Netherlands. **Livestock Production Science**, v.26, p.107-118, 1990.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO

ANIMAL, 16, 2005, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia – GO: Editora Colégio Brasileiro de Reprodução, 2005, CD-ROM.

ROTA A.; PENZO N.; VICENTI L. et al. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay of testing *in vitro* fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1415-1420, 2000.

SALISBURY G.W.; MERCIER, E. The reliability of estimates of the proportion of morphologically abnormal spermatozoa in bull semen. **Journal Animal Science.**, v. 4, p.174-8, 1945.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal.** Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, Belo Horizonte, 1998, 221p.

SAS® Statistical Analysis System. **User's Guide: Statistics**, version 6.11 edition Cary: SAS Institute, 1995.

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P. et al. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 387-395, 2007.

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.

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A. et al. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, v. 42, n.1, p. 87-91, 1984.

THUNDANTHIL, J.; PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. et al. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 57, p. 35-50, 1999.

THUNDANTHIL, J.; PALOMINO, J.; BARTH, A.D. et al. Fertilizing characteristics of bovine sperm with flattened or indented acrosomes. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 231-243, 2001.

UNANIAN, M.M. **Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 21p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 56).

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

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

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N. et al. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. **International Journal of Andrology**, v. 21, p. 207-216, 1998.

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