

MAIANA SILVA CHAVES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SÊMEN REFRIGERADO E
CONGELADO DE TOUROS 5/8 GIROLANDO**

GARANHUNS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES

MAIANA SILVA CHAVES

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SÊMEN REFRIGERADO E
CONGELADO DE TOUROS 5/8 GIROLANDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Coutinho
Bartolomeu

Co-orientador: Antônio Santana dos Santos
Filho

GARANHUNS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SÊMEN REFRIGERADO E
CONGELADO DE TOUROS 5/8 GIROLANDO

Dissertação elaborada por
MAIANA SILVA CHAVES

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu
Presidente da Banca – Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Dr. Sebastião Inocêncio Guido
Instituto Agrônômico de Pernambuco/IPA

Prof. Dr. André Mariano Batista
Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que me permitiu a realização do mesmo e a presença de pessoas tão importantes como a da minha família perto de mim. Grata

AGRADECIMENTOS

- ✓ Inicialmente a minha família que, talvez sem perceber, me dá a força e base necessária para cada conquista na minha vida.
- ✓ As minhas novas amizades construídas durante este percurso e que me ajudaram através de debates e de sorrisos a seguir em frente.
- ✓ A Dr. Júlio, sempre presente nos momentos angustiantes trazendo conforto, a Dr. Antônio Santana pela confiança.
- ✓ Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) pelo apoio a pesquisa fornecendo espaço e animais.
- ✓ Ao Laboratório de Andrologia (ANDROLAB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela ajuda na realização das análises, em especial a Pierre.
- ✓ A CAPES pela bolsa de estudo que ajudou na execução do projeto de pesquisa.
- ✓ Ao meu orientador, Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu, pela grande confiança depositada, conhecimentos adquiridos e pela calma passada.
- ✓ A todos que contribuíram de alguma forma com esse trabalho

RESUMO

Avaliação *in vitro* do sêmen refrigerado e congelado de touros da raça 5/8 Girolando

A utilização do sêmen de touros 5/8 Girolando é uma maneira de disponibilizar material genético de uma raça especializada em ambientes mais hostis. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi analisar *in vitro* o sêmen de reprodutores dessa raça, concomitante a comparação das alterações do sêmen da mesma partida submetido a refrigeração (24 e 48 horas) e congelação, às análises seminais de touros expostos às mesmas condições verificando correlações e principalmente, obtenção de valores padrões de análises seminais *in vitro*. Análises de motilidade total, motilidade progressiva, velocidade curvilínea e batimento flagelar cruzado mostraram diferença estatística entre os tratamentos de refrigeração e congelação, com o fator touro influenciando nos resultados de integridade de membrana plasmática, potencial de membrana acrossomal e condensação da cromatina. Dentre as variáveis, a integridade da membrana plasmática foi a variável de maior correlação com as demais estudadas. As análises seminais *in vitro* de touros 5/8 Girolando submetidos a baixas temperaturas contribuirá para o conhecimento dos valores padrões para as variáveis analisadas.

Palavras-chave: sêmen, 5/8 Girolando, criopreservação

ABSTRACT

***In vitro* evaluation of chilled and frozen semen of 5/8 Girolando bulls**

The use of semen from 5/8 Girolando bulls is a way to turn viable genetic material from a specialized breed in the harshest environments. In this sense, the objective of this study was to analyze *in vitro* the semen from this breed, concomitant to the comparison of semen changes the same sample subjected to cooling (24 and 48 hours) and freezing, the seminal analysis of bulls exposed to the same conditions and checking correlations between them and mainly obtain standard values for 1 *in vitro* seminal assays. Analyses of total motility, progressive motility, curvilinear speed and beat cross frequency showed statistical difference between the cooling and freezing treatments, with the bull factor influencing the results of plasma membrane integrity, acrosome membrane potential and chromatin condensation. Among the variables, the integrity of the plasma membrane was the variable that presented the highest correlation with the other studied. The *in vitro* seminal analyzes of 5/8 Girolando bulls subjected to low temperatures will contribute to the knowledge of standard values for the analyzed variables.

Key words: semen, 5/8 Girolando, cryopreservation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	
2.1. Geral	11
2.2. Específicos	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	
3.1. Características da célula espermática	11
3.2. Conservação da célula espermática	13
3.2.1. Refrigeração do sêmen	14
3.2.2. Congelação espermática	15
3.3. Análises <i>in vitro</i> de espermatozoides	17
3.3.1. Morfologia espermática.....	18
3.3.2. Análises computadorizadas	19
3.3.3. Sondas fluorescentes	20
3.3.4. Análise da cromatina	21
4. REFERÊNCIAS	24
5. ARTIGO CIENTÍFICO: Avaliação <i>in vitro</i> do sêmen refrigerado e congelado de touros da raça 5/8 Girolando	32
6. APÊNDICE	
6.1. APÊNDICE A- Espermatozoides corados com azul de toluidina	47
6.4. APÊNDICE B- Espermatozoides visualizados por microscópio de epifluorescência corados com FITC-PNA	47
6.5. APÊNDICE C- Espermatozoides visualizados por microscópio de epifluorescência corados com CFDA-IP	48
7. ANEXO	
7.1. ANEXO A - Normas para publicação da revista Ciência Rural	48

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia, uso ou manipulação de um organismo ou de seus componentes (WETHERINGTON, 2010), quando aplicada na reprodução permite maximizar o uso da genética superior para a obtenção de melhores resultados produtivos (VITA, 2006).

Dentre as biotecnologias, a congelação do sêmen trouxe a possibilidade de diminuição dos custos com aquisição de animais geneticamente superiores, longo período de armazenamento seminal, criação de banco de germoplasmas, racionalização do uso do reprodutor com aumento da relação macho/fêmea e controle de doenças venéreas (VITA, 2006). No entanto, se reconhece que essa forma de conservação espermática imprime alterações nessas células decorrentes das etapas da congelação e da produção de substâncias que resultam numa diminuição em sua fertilidade quando comparadas as de um sêmen fresco (WATSON, 2000).

A formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozóide, lesões no DNA, estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores (BALL, VO, 2001) são alguns efeitos deletérios impostos pela congelação que justificam o retorno de estudos sobre refrigeração do sêmen, uma vez que esta metodologia também disponibiliza gametas viáveis para serem utilizados em biotecnologias. Todavia, as baixas temperaturas da refrigeração, também influenciam em diversos aspectos a viabilidade espermática (SOARES, GUERRA, 2009) e aspectos relacionados ao processo de refrigeração como os meios diluidores a serem utilizados, sistemas de manutenção e transporte seminal, longevidade do material genético, recomendações técnicas e procedimentos para sua utilização não apresentam uma definição clara na literatura (CRESPILHO, 2010).

Diante de inevitáveis injúrias causadas pela baixa temperatura que levam a uma redução da fertilidade, são necessários estudos mais amplos sobre vários aspectos relacionados à fisiologia da célula espermática e à melhoria dos testes aplicados para analisar a viabilidade dos espermatozoides submetidos à refrigeração, congelação e descongelação.

Análises seminais que predizem a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen a partir da quantificação e qualificação das diferentes subpopulações espermáticas vem sendo utilizadas para auxiliar na compreensão das lacunas ainda presente em alguns

protocolos (SOUSA, 2007). Suas bases estão na associação de características espermáticas necessárias para assegurar a fertilização do ócito, como uma membrana citoplasmática e acrossoma íntegros e alto potencial de membrana mitocondrial. Da mesma forma, a integridade da cromatina, uma vez que é essencial para o desenvolvimento embrionário após a fertilização e união dos pró-núcleos feminino e masculino (CELEGHINI, 2005).

Além dos pontos relacionados a diminuição da temperatura que modificam a estrutura espermática e assim sua finalidade, quando congelado existem fatores variáveis como a alimentação do reprodutor (SILVA, GUERRA, 2011) e o fator touro (SALVADOR, 2008) que interferem na quantidade de espermatozoides viáveis presentes no sêmen descongelado.

Por representar metade da composição genética de sua progênie, a seleção de touros deve receber ênfase e se basear na sua capacidade genética de transmissão de características produtivas e reprodutivas. A escolha de touros mestiços é uma forma de introduzir o material genético de raças especializadas em ambientes tropicais, entretanto, seu uso só será vantajoso após o seu devido conhecimento com posterior aplicação e comprovação de acréscimos nos índices reprodutivos e de produção (SOUZA, 2012).

Em 1978, o Programa de Cruzamento Dirigido (PROCRUZA), delegada pelo Ministério da Agricultura teve o objetivo de formar uma população bovina sustentável em regiões tropicais e subtropicais, resultante de cruzamentos entre raças de carne e leite. Como resultado, a raça 5/8 Girolando mostrou bons resultados e desde então vem tendo reconhecimento nacional e internacional, tornando-se a preferida para produção de leite nas regiões tropicais e sendo a responsável por 80% do leite brasileiro (Associação Brasileira de Criadores de Girolando, 2015). Em 2007 foi implantado o Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando, objetivando identificar indivíduos superiores, multiplicar a genética de forma orientada, avaliar características econômicas e promover a sustentabilidade da atividade leiteira (SILVA et al., 2012).

Cabe ressaltar que, além da representatividade na bovinocultura leiteira, o Girolando proporciona grandes vantagens socioeconômicas por várias alternativas de criação (Associação Brasileira de Criadores de Girolando, 2015). Entretanto, apesar dessa representatividade na produção de leite e importância para os produtores, trabalhos técnicos que envolvam essa raça e necessários para uma maximização em sua exploração são esporádicos e escassos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar a viabilidade, *in vitro*, do sêmen de reprodutores da raça 5/8 Girolando armazenados sob refrigeração e congelamento.

2.2 Específicos

- Gerar valores padrão de análises seminais *in vitro* de touros da raça Girolando 5/8;
- Comparar alterações do sêmen da mesma partida submetido a refrigeração (24 e 48 horas) e congelamento;
- Analisar modificações espermáticas em ejaculados expostos às mesmas condições;
- Verificar correlações entre as análises seminais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características da célula espermática

Os espermatozoides (sptz) são células terminais formadas a partir de divisões diferenciações e sequenciais das células germinativas primordiais (espermatogênese) ocorridas nos túbulos seminíferos que formam os testículos. Para alcançarem a capacidade de fertilizar o ovócito, os sptz necessitam passar pelo processo de maturação que ocorre após interação com o ambiente epididimário (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2006). Durante sua

formação, os sptz perdem sua habilidade de biossíntese, reparação, crescimento e divisão celular (YOSHIDA, 2000).

A membrana plasmática envolve toda a célula espermática e apresenta alguns domínios relacionados com mudanças em sua composição. Mantém o gradiente químico de íons e de outros componentes solúveis intracelular devido a sua característica semipermeável (SILVA, GADELLA, 2006). É composta por proteínas que facilitam o transporte de glicose e de frutose (substratos para a glicólise) e rica em fosfolipídeos, cuja distribuição é fisiologicamente assimétrica, com fosfatidilcolina e esfingomiéline localizadas no folheto externo da bicamada lipídica, enquanto fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina encontram-se situadas no folheto interno (LADHA, 1998).

Além da integridade das organelas e do genoma haplóide, a funcionalidade das membranas é um pré-requisito para que o sptz tenha a capacidade de fertilizar o oócito através da ocorrência dos eventos de capacitação espermática, penetração nos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão dos gametas (CRESPILHO et al, 2006). A manutenção dos lipídios e das proteínas das membranas no estado líquido-cristalino, permite a movimentação de seus componentes, garantindo suas interações (GADELLA, 2008) e desempenho de suas funções. Qualquer modificação na organização em mosaico fluído da membrana pode provocar alterações na interação lipídio-proteína e assim nos receptores de membrana e em suas funções (NUNES et al., 2006).

O metabolismo oxidativo das células espermáticas tem como resultado possível a geração de biometabólitos ativos do oxigênio, denominados espécies reativas ao oxigênio (NUNES et al., 2006), as quais em pequenas quantidades são necessárias para alguns processos fisiológicos como capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão do espermatozoide com o ovócito (O'FLAHERTY et al., 2003). Em situações em que há desequilíbrio na concentração de espécies reativas ao oxigênio (ROS), seja pelo aumento de sua produção ou pela diminuição da atividade de substâncias antioxidantes, pode ocorrer estresse oxidativo (SIKKA, 1996), resultando em danos estruturais e funcionais, o que pode levar à perda de mobilidade, reação acrossomal prematura, peroxidação lipídica, apoptose, e dano no DNA (MAIA, BICUDO, 2009).

A origem de ROS no ejaculado está relacionada aos espermatozoides morfológica ou funcionalmente anormais e a leucócitos que podem estar presentes no ejaculado e que podem ser a causa de infertilidade (AGARWAL, PRABAKARAN, 2005). Ressaltando que a manipulação de sêmen em técnicas de reprodução assistida é capaz de ativar a produção de

ROS e este aspecto pode ser agravado pela redução das concentrações de antioxidantes no plasma seminal como consequência do processo de diluição (AGARWAL et al., 2006).

Segundo Gonzalez (2004), durante o metabolismo espermático são gerados metabólitos tóxicos que contribuem para o aumento de ácido lático no meio extracelular, tornando o meio ácido e reduzindo sua longevidade e fertilidade. É diante dessa realidade metabólica que o princípio da conservação do sêmen para utilizá-lo em técnicas reprodutivas está na redução ou parada do metabolismo das células espermáticas (YOSHIDA, 2000).

3.2. Conservação da célula espermática

A exigência de sêmen de touros de alto mérito genético tem sido o principal impulso para o desenvolvimento de tecnologias para seu armazenamento. Para que esteja disponível por um maior tempo após sua coleta, a sobrevivência dos espermatozoides está inversamente relacionada com a sua atividade metabólica que pode ser alcançada após seu armazenamento em baixas temperaturas (VISHWANATH, SHANNON, 2000).

No entanto, características inerentes a um sptz que refletem na capacidade de fertilizar o oócito como morfologia, atividade metabólica e membranas normais são perdidas ou alteradas durante o estresse osmótico e oxidativo oriundos tanto no processo de refrigeração quanto na congelação/descongelação, contribuindo para a antecipação da capacitação e da reação acrossomal e assim reduzindo a longevidade do espermatozoide (SOARES, GUERRA, 2009).

Sendo esse gameta uma célula com capacidade biossintética limitada, tornando difícil a substituição de qualquer molécula que tenha sido danificada (AITKEN, 1995) é necessário minimizar os danos que o manuseio e o armazenamento podem gerar a esta célula.

3.2.1. Refrigeração do sêmen

A manutenção do sptz em temperaturas de 5° C é uma alternativa para preservá-lo por longos períodos por reduzir seu catabolismo. De acordo com Watson (2000) do número total de doses produzidas no mundo, apenas 5% são usadas na forma refrigerada e principalmente na Nova Zelândia, seguida pela França, Holanda, Austrália e Europa Oriental (VISHWANATH, SHANNON, 2000). No Brasil, nos últimos anos, muitos trabalhos têm sido feitos para avaliar a utilização de sêmen refrigerado na Inseminação Artificial em Tempo Fixo (PAPA et al., 2012).

A descoberta da gema de ovo como um agente protetor a baixas temperaturas por Phillips (1939) impulsionou o uso da refrigeração (VISHWANATH, SHANNON, 2000). Com esse tratamento é possível ter sptz viáveis por um maior tempo quando comparado ao fresco, possibilidade de utilização de touros geneticamente superiores intolerantes ao processo de criopreservação, redução da dose inseminante diante de uma maior qualidade dos espermatozoides e do custo de estocagem (YOSHIDA, 2000).

A frequência de aplicação da refrigeração no sêmen varia por espécies. Em algumas são esporádicas, em outras são mais frequentes e em algumas a única forma de se utilizar o sêmen de reprodutores superiores, devendo-se a fisiologia e bioquímica dos espermatozoides (ORTEGA, 2003).

De acordo com essas características espermáticas que variam entre as espécies, o processo de refrigeração pode influenciar em diversos aspectos a viabilidade espermática. Substâncias tampões podem quelar íons metálicos alterando as interações entre íons e os lipídeos de membrana; alterações nas proteínas de ligação; segregação de lipídeos e formação de lipoproteínas alteradas; mudanças no balanço bioenergético que influenciam a disponibilidade de açúcares livres e a manutenção de processos fisiológicos essenciais, como batimentos flagelares e funcionamento dos mecanismos de troca de membrana (HAMMERSTEDT et al., 1990). Da mesma forma, Arruda e colaboradores (2010) afirmam que durante o período de exposição dos sptz a refrigeração ocorre uma reorganização dos componentes das membranas que se feita de modo inadequado irá desenvolver um padrão anormal do movimento, perda rápida de motilidade, lesões no acrossomo, danos à membrana plasmática e perda de componentes intracelulares.

Apesar desses danos possíveis de ocorrer na refrigeração, o decréscimo na viabilidade e fertilidade nos espermatozoides congelados tem motivado trabalhos nessa área (PAPA et al., 2012).

Em 2013, Fujita et al., compararam o uso do sêmen refrigerado por até 24 horas em relação ao sêmen congelado na inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e encontraram resultados que puderam considerar a refrigeração como uma alternativa viável. Bucher et al., (2009) utilizando sêmen refrigerado com uma concentração reduzida de 85% da dose do sêmen congelado na IATF obtiveram respostas semelhantes entre os ejaculados. Corroborando, Crespilho (2010) afirma, após sua aplicação, que a utilização do sêmen refrigerado por 24 horas é uma estratégia eficiente para aumentar a taxa de concepção de vacas inseminadas em tempo fixo.

Nos trabalhos com fertilização *in vitro*, a utilização de sêmen congelado mostra-se como um dos fatores que interferem negativamente no resultado final (COLOMBO et al., 2010).

Apesar das inevitáveis injúrias causadas pela baixa temperatura, esses trabalhos desenvolvidos, mostram resultados que justificam a utilização de sptz refrigerados ou de maiores estudos.

3.2.2. Congelação espermática

Nos últimos 50 anos a criopreservação do sêmen trouxe profundos impactos nas biotecnologias reprodutivas humana e animal (STORNELLI, 2005). Após a descoberta de glicerol como crioprotetor por Polge e colaboradores (1949) permitindo que os espermatozoides fossem armazenados por longos períodos, ocorreu o beneficiamento e melhoramento de animais de importância agrícola, contribuindo com a conservação de espécies ameaçadas, permitindo a superação de aspectos da infertilidade masculina em seres humanos (WATSON, 2000).

Apesar desses benefícios que a congelação traz, independente do protocolo para criopreservação, 40-50% da população de espermatozoides não sobrevivem em muitas espécies (WATSON, 2000), podendo ainda apresentar variações entre indivíduos da mesma espécie influenciadas por variações genéticas (MARTINS, 2009). De acordo com Peña et al.

(2003) as variações na criopreservação ocorrem entre indivíduos, ejaculados de um mesmo indivíduo e dentro de um mesmo ejaculado devido a variações entre subpopulações espermáticas.

Ortega et al. (2003) classificam a conservação pelo frio para alguns reprodutores como um problema que leva a alterações bioquímicas e funcionais, afirmando que independentemente da técnica de congelação e descongelação o sêmen criopreservado apresenta um maior número de células lesadas e apoptóticas em relação ao sêmen *in natura*.

Em 2008, Muiño e colaboradores demonstraram a existência de 4 subpopulações de espermatozoides (baseado na análise cinética computadorizada) no sêmen fresco e que essas subpopulações têm sua frequência alterada após a congelação e a depender do touro utilizado. Da mesma forma, Watson (2000), classificou os touros como produtores de sêmen de alta e baixa congelabilidade a depender das características estruturais da membrana (geneticamente determinado). As alterações biológicas e funcionais são justificadas pela composição heterogênea das células oriundas de diversas ondas espermátogênicas, com diferentes atributos celulares de qualidade (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2006) que respondem de maneira diferente a mudanças de temperatura (MUIÑO et al., 2008).

Watson (2000) de forma sucinta aponta que os danos da congelação/dcongelação são devido a mudanças na temperatura, estresse tóxico e osmótico presente em concentrações molares de crioprotetores e formação e dissolução do gelo extracelular, tendo como resultado, alterações na membrana do espermatozoide e lesões no DNA. Holt (2000) relata que essas células normalmente resistem à redução da temperatura, entretanto não suportam a formação de cristais de gelo que determina a retirada de água do sistema, levando ao desequilíbrio osmótico com conseqüente desidratação celular.

Ortega et al.(2003), relatam que o armazenamento do sêmen, principalmente no estado congelado, causa mudanças bioquímicas e funcionais que levam a redução da motilidade e da viabilidade espermática e, prejuízos durante o transporte dos gametas no sistema reprodutivo da fêmea e durante a fertilização (LEBOEUF et al., 2000).

As membranas espermáticas são os principais locais afetados pelas mudanças de temperatura (STORNELLI, 2005). Estresses oriundos da transição de sua estrutura do estado líquido cristalino para o de gel deixam as cadeias dos ácidos graxos rígidas e paralelas (NUNES, 2006) com áreas fracas susceptíveis a rupturas e fusões, alterando sua permeabilidade e conseqüente modificações em sua funcionalidade e metabolismo. (HAMMERSTEDT et al., 1990)

Segundo Thomas et al. (2006), semelhante à capacitação, a criopreservação provoca na membrana plasmática estado de maior fluidez e exposição a sítios de ligação a moléculas externas, requerendo menor tempo para a célula se capacitar. Stornelli (2005) classifica as mudanças ocorridas durante baixas temperaturas como uma versão desorganizada da capacitação espermática.

3.3. Análises *in vitro* de espermatozoides

O uso crescente das biotécnicas reprodutivas como a inseminação artificial, transferência embrionária e produção *in vitro* de embriões exige uma avaliação laboratorial prévia do sêmen dos touros doadores (LARSSON, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2000). O sêmen de boa qualidade contribui morfológicamente e bioquimicamente para o desenvolvimento dos componentes nucleares e citoplasmático do embrião (SILVA, 2006),

Diante de uma célula complexa, como o espermatozoide, que envolve inúmeros compartimentos com funções específicas na fertilização (MAZIERO et al., 2009), se utilizar de testes complementares que vão além do exame *in vivo* do reprodutor, que avalia a integridade da membrana plasmática, condição acrossomal, integridade da cromatina e de forma multifatorial é mais uma forma de entender, justificar e procurar alternativas para os resultados encontrados nas biotecnologias (ARRUDA et al, 2010).

O uso de avaliações *in vitro* de espermatozoides vem se tornado mais frequente, seja pela possibilidade de prever a capacidade de fertilização dos espermatozoides e assim uma maximização dos resultados produtivos, redução do tempo ou na quantidade de espermatozoides por dose, diminuição dos custos na manutenção de touros que podem ser inférteis ou estarem passando por momento de infertilidade, ajuda no prognóstico de quadros clínicos, acompanhamento do desenvolvimento reprodutivo (FRENEAU, 2011), mudanças que a dieta pode gerar na espermatogênese e fornecimento de informações sobre subpopulações de células espermáticas (AMANN, KATZ, 2004).

Existe a necessidade de algumas características essenciais para que os espermatozoides sejam considerados qualitativamente viáveis e potencialmente férteis (SOARES, GUERRA, 2009). Destas, usualmente a motilidade e a morfologia espermáticas

são as características mais avaliadas nas amostras de sêmen, sendo apontadas por muitos autores como importante ferramenta na seleção de um ejaculado (MATOS et al., 2008)

3.3.1. Morfologia espermática

Saake et al. (1998) afirmaram que defeitos específicos na morfologia estrutural das células espermáticas correlacionam-se com a sub e infertilidade masculina, sendo sua alta frequência ou a alta incidência de um único defeito podem reduzir a fertilidade. Holroyd et al. (2002) relatam que em trabalhos realizados na Austrália, de todas as características aferidas nos touros, a morfologia espermática foi a que teve maior repetibilidade e relação com a produção de bezerros/touro na estação reprodutiva.

Diante da influência que a morfologia espermática tem na fertilidade, seja por falha em alcançar o local de fertilização, em fertilizar o oócito ou em sustentar o desenvolvimento embrionário, são propostos alguns tipos de classificação. Lagerlof (1934) sugere de acordo com sua origem: primárias, desenvolvidos durante a espermatogênese; secundária, durante o armazenamento até ejaculação; terciária, manipulação após a ejaculação. Blom (1973), de acordo com seu grau de interferência na fertilidade: defeitos maiores e menores. Segundo o Henry et al. (2013), recomenda-se para ejaculados de touros, o mínimo de 70% de espermatozoides normais, máximo de 20% de defeitos maiores e 30% de defeitos menores.

Mais recente Saake (2008) classifica as alterações espermáticas baseadas nas características espermáticas importantes para o processo de fertilização *in vivo*. Defeitos que interferem desde o transporte dos espermatozoides até o início da fertilização são considerados compensáveis. Exemplo: defeitos de cauda. Alterações que interferem na fertilização e o início da embriogênese são tidos como não compensáveis, exemplificado pelos erros na cromatina dos espermatozoides (FRENEAU, 2011). Os defeitos compensáveis podem ser anulados pelo aumento do número de células espermáticas na dose inseminante. No segundo caso, o aumento da concentração de espermatozoides não levará à melhoria da taxa de fertilidade (CHENOWETH, 2005)

Cabe ressaltar, que existem ainda algumas patologias que se mantêm constantes em análises seminais de alguns touros e que podem estar associados com fertilidade reduzida ou

até esterilidade, os defeitos herdáveis (FRENEAU, 2011). Biotecnologias reprodutivas como a fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática (ICSI) que exclui as barreiras naturais do trato reprodutivo feminino, que por sua vez seleciona espermatozoides mais aptos para fertilizar, mantêm os defeitos genéticos na população e deixa o prognóstico de melhoria espermática ruim (CHENOWETH, 2005).

Para análises de morfologia espermática existem também sistemas automatizados (FRENEAU, 2011). No entanto, as análises usualmente utilizadas para a morfologia dos espermatozoides são esfregaços corados (exemplo de corantes: Wright, Rosa de Bengala, Giemsa e eosina-nigrosina, Karras) e pela técnica de preparação úmida com microscópio de contraste de fase ou de contraste diferencial de interferência de fase. Freneau et al.(2010) afirmam que esfregaços corados apresentam menor acuidade em decorrência de aumento dos artefatos de técnica aumentando os defeitos de cauda, peça intermediária, cabeça isolada e, subvalorizam alguns defeitos maiores, tais como de acrossoma, vacúolos e gotas, recomendando a preparação úmida.

3.3.2. Análises computadorizadas

Objetivando prever com confiabilidade e repetibilidade a fertilidade dos reprodutores, técnicas com caráter objetivo têm sido difundidas. Nesse contexto, a avaliação da motilidade por análises computadorizadas vem sendo frequentemente utilizadas (AMANN, KATZ, 2004), com o propósito de aperfeiçoar a rotina laboratorial

Neste tipo de análise, as trajetórias dos espermatozoides móveis são matematicamente processadas e os resultados refletem uma série de parâmetros que definem precisamente o movimento exato de cada espermatozoide, com resumos estatísticos das subpopulações (ARRUDA et al., 2011). A associação de múltiplas variáveis de movimento obtidas pelos sistemas automáticos de análise seminal (CASA) mostra maior correlação com fertilidade *in vivo* em relação à utilização de apenas uma característica de movimento. Leite (2008) afirma que a avaliação automatizada da motilidade espermática é de grande interesse devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides. Sendo este aspecto confirmado por Verstegen et al. (2002),

os quais observaram diferenças significativas no padrão de movimento desempenhado por espermatozoides que alcançam altas e baixas taxas de fertilização.

Os parâmetros gerados pelo CASA são: *Velocidade curvilínea* (VCL- $\mu\text{m/s}$): velocidade da trajetória real do espermatozoide. É sempre a maior das três velocidades; *Velocidade linear progressiva* (VSL- $\mu\text{m/s}$): é a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide, sendo sempre a mais baixa das três velocidades; *Velocidade média da trajetória* (VAP- $\mu\text{m/s}$): velocidade da trajetória média do espermatozoide. *Amplitude de deslocamento lateral da cabeça* (ALH - μm): é a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real; *Frequência de batimento flagelar cruzado* (BCF- Hz): é o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento; *Wobble* (WOB- %): expressão utilizada para a relação entre os caminhos médios e curvilínea, calculada por $(\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100$. *Retilinearidade* (STR - %): é a relação percentual entre VSL e VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta; *Linearidade* (LIN - %): relação percentual entre VSL e VCL. Quanto mais o espermatozoide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade (MORTIMER, 2000; MATOS et al., 2008).

Buscando correlacionar os parâmetros do CASA com a taxa de fertilização Verstegen et al. (2002) verificaram que os valores de VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fertilizados, o VCL e a ALH apresentam grande correlação com a taxa de fertilização pela maioria dos estudos e o ALH, em específico, está relacionado com a capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, sendo este parâmetro, um dos que tem efeito sobre a fertilização.

3.3.3 Sondas fluorescentes

O uso de sondas fluorescentes isoladamente ou em combinação permite pontuar efeitos que certos manejos e seus consequentes agentes agressores podem causar na integridade e na função celular (CELEGHINI, 2005). Por observação em microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, permite a avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, do potencial mitocondrial, do índice de fragmentação de DNA, da

integridade do flagelo, da peroxidação lipídica, reação acrossômica, entre outros (CELEGHINI, 2005; MONTESINOS, 2012; SOARES, GUERRA, 2009).

A integridade da membrana plasmática dos sptz é crucial para que ocorram eventos fisiológicos relacionados ao processo de fertilização e para que seu tempo de sobrevivência não seja abreviada. A avaliação da integridade da membrana plasmática pode ser feita através das sondas de brometo de etídio, iodeto de propídio (PI), Hoechst 33258 e 33342, SYBR-14 e o diacetato de carboxifluoresceína (CELEGHINI, 2005; ARRUDA et al., 2010).

Na mesma diretriz da fertilização, é inerente também a integridade do acrossomo que pode ser avaliada através de técnicas que utilizam as sondas isoladamente ou em associação. Pode –se utilizar sonda fluorescente LysoTracker Green DND-26, técnicas de imunofluorescência em conjunto com fluoróforos, usar lectinas que possuem especificidade a glicoproteínas da membrana acrossomal conjugadas a fluoresceína (ex: isotiocionato de fluoresceína, FITC) como a *Pisum sativum* (PSA) e *Arachis hypogea* (PNA) que se ligam a glicoproteínas da membrana acrossomal externa ou com componentes enzimáticos da matriz acrossômica (MONTESINOS, 2012), *Ricinus comunis* (RCA), ou *Conconavalina ensiformis* (ConA).

Uma vez que a função fisiológica das mitocôndrias nas células é realizar fosforilação oxidativa na membrana interna produzindo ATP como fonte de energia metabólica, alterações no potencial das mitocôndrias podem ser um bom indicador de seu comprometimento funcional (PEÑA et al. 2003). Ao contrário de outras sondas que refletem apenas células com função mitocondrial (ex: rodamina 123), o fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 possui a capacidade de diferenciar mitocôndrias com potencial de membrana alto e baixo (CELEGHINI, 2005). Em mitocôndrias com potenciais de membrana alta, JC-1 forma agregados multiméricos que emitem cor laranja. Em mitocôndria com baixo potencial de membrana, JC-1 forma monómeros que emitem cor verde (PEÑA et al., 2003).

3.3.4. Análise da cromatina

Durante a espermatogênese dos mamíferos, as histonas, proteínas nucleares ricas em lisinas, são substituídas em parte ou totalmente por nucleoproteínas específicas dos espermatozoides, denominadas protaminas ou proteínas queratinosas, as quais possuem um

caráter mais básico, ricas em arginina e cisteína oxidada (ARRUDA et al., 2010). As protaminas se ligam ao DNA possibilitando que as duplas hélices se compactem, conferindo estabilidade ao núcleo do sptz, tornando-o resistente à desnaturação e formando a cromatina espermática (BELETTI, 2013). 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 (ARRUDA et al., 2010).

A integridade do DNA de espermatozoides de mamíferos é de importância vital para a contribuição paterna de um descendente normal (SHIBAHARA et al., 2003). Danos nessa estrutura podem resultar em morte celular e na indução de mutações que podem ser transportadas para a próxima geração ou resultar em infertilidade do macho a depender da proporção da intensidade da alteração (CARREIRA, 2008; BELETTI, 2013).

Segundo Silva e Gadella (2006), aberrações de DNA não aparecem na fertilização, mas no início da expressão de DNA embrionário que ocorre entre 4 e 8 células em bovinos. A forma com que alterações na cromatina interferem na fertilização depende do grau dessa modificação. Espermatozoides com graves alterações cromatínicas teriam alterações na forma da cabeça e, portanto, na sua hidrodinâmica, levando a uma motilidade inadequada, interferindo diretamente no processo de fecundação. Modificações menos graves possuiriam danos no DNA que impossibilitariam a união dos pró-núcleos masculino e feminino. Modificações mais leves poderiam interferir em etapas posteriores do desenvolvimento embrionário, o que poderia levar à morte embrionária (BELETTI, 2013).

As causas mais frequentes de anormalidades na estrutura da cromatina são: deficiência na recombinação durante a espermatogênese conduzindo a apoptose da célula; maturação anormal da espermátide; estresse oxidativo; processamentos de diluição, centrifugação, criopreservação e sexagem para utilização dos espermatozoides em biotécnicas reprodutivas, como inseminação artificial e produção *in vitro* de embriões (AGARWAL, SAID, 2003; VIRRO et al., 2004; CELEGHINI, 2005)

Os danos à cromatina podem ser avaliados basicamente pela frequência de fragmentação da cromatina via apoptose, por incidência de fraturas no DNA e pelo grau de condensação do DNA pelas protaminas (SILVA, GADELLA, 2006). Nas análises de condensação da cromatina dos sptz, existem as análises citoquímicas utilizando corantes nucleares, como o azul de anilina e azul de toluidina (TALEBI et al., 2012).

O azul de toluidina (AZTO) é um corante catiônico que exhibe fenômeno metacromático, isto é, alteração na cor induzida pela ressonância de elétrons entre as

moléculas do corante. No método de azul de toluidina é avaliada a capacidade de moléculas do corante se ligarem aos grupos fosfatos do DNA, o que está diretamente relacionado com sua compactação. No sptz anormal, a cromatina está pouco condensada, tendo maior número de grupos fosfato disponível para a ligação com o corante, sendo observada coloração azul escura à violeta. Se a cromatina estiver íntegra, altamente condensada, a coloração produzida será azul clara (BELETTI, 2013).

4. REFERÊNCIAS

AGARWAL A, SAID TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction Update**, v.9, p.331-345, 2003

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A. Oxidative stress and antioxidants in male infertility: a difficult balance. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v.3, p. 1-8, 2005.

AGARWAL, A. et al. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and Sterility**, v. 86, p. 503-512, 2006.

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-68, 1995.

AMANN, R. P.; KATZ, D.F. Reflections on CASA After 25 Years. **Journal of Andrology**, v.25, p.317-325, 2004.

ARRUDA, R.L. et al. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.168-184, 2010.

ARRUDA, R.P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.145-151, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE GIROLANDO, **Pedra Angular. 2015.** Disponível em: <
<http://www.girolando.com.br/index.php?paginasSite/girolando,1,pt>> Acesso em: jan. 2015

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 1061-1069, 2001.

BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, p.92-96, 2013.

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinary Medicine**, v.25, p.383-391, 1973.

BUCHER, A., et al. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. **Theriogenology**, v.71, p.1180–1185, 2009.

CARREIRA, J. T. **Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, potencial mitocondrial, cromatina e produção de embriões in vitro de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal**. 2008. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária)- Programa de Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp

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

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

COLOMBO, A.H.B. et al. Estimação dos fatores que interferem diretamente e indiretamente nos resultados da fecundação in vitro (FIV). **V Mostra interna de trabalhos de iniciação científica**, 2010. Disponível em:<
http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/mostras/quin_mostra/antonio_hugo_bezerra_colombo_1.pdf> Acesso em 12 out. 2014.

CRESPILHO, A. M. **Estudo comparativo de diferentes metodologias de preservação do sêmen bovino para a utilização em programas de inseminação artificial (IATF)**. 2010.

114f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

CRESPILHO, A.M. et al. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelamento de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. **Ars Veterinaria**, v. 22, p. 229-235, 2006.

FRENEAU et al. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.176-181, 2010.

FRENEAU, G.E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.160-170, 2011.

FUJITA, A. S. et al. Taxa de gestação em novilhas sincronizadas para IATF e inseminadas com sêmen resfriado e congelado. **Archives of Veterinary Science** v.18, p.13-21, 2013.

GADELLA, B.M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 229–236, 2008.

GONZALEZ, R. A.F. **Efeitos da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas dos espermatozoides bovino**. 2004 Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

HAMMERSTEDT, R. H. et al. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p.73-88, 1990.

HENRY, M et al. Exame Andrológico. In ____ **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ª ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. Cap 1, p.15-26.

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

HOLROYD R.G. et al. Bull selection and use in northern Australia 4: Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.67-79, 2002.

LADHA, S. Lipid Heterogeneity and Membrane Fluidity in a Highly Polarized Cell, the Mammalian Spermatozoon. **The journal of Membrane Biology**, v. 165, p. 1–10, 1998.

LAGERLOF, N. Morphologische Untersuchungen uber. Veranderim spermabild und in den Hoden bei Bulle mit Verminderter oder auf gehobe ver Fertilitat. "**Acta pathologica et microbiologica Scandinavica**, v.1, p.254, 1934.

LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 327–336, 2000.

LEBOEUF, B. et al. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113-141, 2000.

LEITE, T.G. **Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touro Gir leiteiro**. 2008. Tese. (Mestre em Ciência Veterinária)- Universidade Federal de Minas Gerais.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.183-193, 2009.

MARTINS, L.F. **Testes complementares em sêmen e avaliação da síntese diferencial de proteínas e peptídeos aniônicos em plasma seminal de touros da raça Nelore classificados como aptos e inaptos a reprodução**.2009. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Curso de Pós- graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa.

MATOS, D.L. et al. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.4, p.225-232, 2008.

MAZIERO, R. R. D., et al. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.6, p.5-10, 2009.

MONTESINOS, I.S. **Avaliação espermática do sêmen criopreservado de touro Curraleiro/Pé Duro em banco de germoplasmas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

MORTIMER, S.T. CASA—Practical Aspects. **Journal of Andrology**, v.21, p. 515–524, 2000.

MUIÑO, R. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 27–39, 2008.

NUNES, D.B. et al. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.1-2, p.42-56, 2006.

O'FLAHERTY, C. et al. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. **International Journal of Andrology**, v.26, p.109-114, 2003.

ORTEGA, A.M. et al. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Uma revisão. **Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe**, v.28, n.12, p.699-704, 2003.

PAPA, F.O. et al. **Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de avaliação**. 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. 2012. Disponível em:< <http://www.sheepembryo.com.br/files/artigos/359.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2014.

PEÑA, F.J. et al. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of diferente fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 85-98, 2003

PHILLIPS, P.H. Preservation of bull semen. **The Journal of Biological Chemistry**. v.130, p. 415, 1939.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can We Increase the Estimative Value of Semen Assessment? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 2–10, 2006.

SALVADOR, D.F. et al. Associação entre o perfil andrológico e a congelação de sêmen de touros da raça Nelore aos dois anos de idade, pré-selecionados pela classificação andrológica por pontos (CAP). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.3, p.587-593, 2008.

SHIBAHARA, H. et al. Clinical significance of the Acridine Orange test performed as a routine examination: comparison with the CASA estimates and strict criteria. **International Journal of Andrology**, v.26, p.236–241, 2003.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. 78-86, 1996.

SILVA, R. T. da. **Correlação da morfometria e da compactação da cromatina de espermatozoides de touro zebuino sobre a taxa de clivagem e formação de blastocistos em programa de produção “in vitro”**. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária/Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

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

SILVA, S.V., GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.370-384, 2011.

SILVA, M.V.G.B. da. et al. **Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando Sumário de Touros Resultado do Teste de Progênie -Julho/2012**, Juiz de Fora, 2012. Acessado em nov. 2014. Online. Disponível em: <http://www.girolando.com.br/baixar.php?arquivo=arquivosSite/progenie/Sumario-de-Girolando2013.pdf>.

SOARES, A.T.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.3, p.53-63, 2009.

SOUSA, D. B. de. **Variabilidade das sub-populações de espermatozóides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos**. 2007. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista/ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

SOUZA, R.R.C de P. **Efeitos ambientais e de grupos genéticos sobre características de produção de sêmen em touros mestiços (Bos taurus x Bos indicus)**. 2012. Dissertação (Mestre em Produção Animal Sustentável) - Curso de pós-graduação em Produção Animal Sustentável, Agência Paulista de Tecnologia em Agronegócios.

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

TALEBI, A. R. et al. Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. **Andrologia**, v. 44, p. 462-70, 2012.

THOMAS, A.D. et al. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, p. 1531–1550, 2006.

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

VERSTEGEN, J. et al. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p.149-179, 2002.

VIRRO, M.R. et al. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. **Fertility and sterility**, v.81, p.1289-1295, 2004

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000.

VITA, B. de. **Biotechnologia e inseminação artificial com sêmen congelado equino**. 2006 Monografia (Mestrado em reprodução animal) – Curso de Pós- graduação em Medicina Veterinária/ Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP.

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

WETHERINGTON, J. **Introduction to Biotechnology: A Georgia Teachers Resource Manual**. 2010 Disponível em: < <https://www.gadoe.org/Curriculum-Instruction-and-Assessment/CTAE/Documents/Teachers-Guide-Biotechnology-GaBIO.pdf>> Acesso em 20 jan. 2015.

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

1 5. ARTIGO CIENTÍFICO

2 Avaliação *in vitro* do sêmen refrigerado e congelado de touros da raça 5/8

3 Girolando

4 In vitro evaluation of chilled and frozen semen of 5/8 Girolando bulls

5

6 **Resumo**

7 A utilização do sêmen de touros 5/8 Girolando é uma maneira de disponibilizar material
8 genético de uma raça especializada em ambientes mais hostis. Nesse sentido, o objetivo desse
9 trabalho foi analisar *in vitro* o sêmen de reprodutores expostos as mesmas condições,
10 comparando as alterações do sêmen de uma mesma partida submetido a refrigeração por um
11 período de 24 horas, 48 horas e congelação. Análises de motilidade total, motilidade
12 progressiva, velocidade curvilínea e batimento flagelar cruzado mostraram diferença estatística
13 entre os tratamentos de refrigeração e congelação, com o fator touro influenciando nos
14 resultados de integridade de membrana plasmática, potencial de membrana acrossomal e
15 condensação da cromatina. Dentre as variáveis, a integridade da membrana plasmática foi a
16 variável de maior correlação com as demais estudadas. As análises seminais *in vitro* de touros
17 5/8 Girolando submetidos a baixas temperaturas contribuirá para o conhecimento dos valores
18 padrões para as variáveis analisadas.

19 Palavras-chave: sêmen, 5/8 Girolando, criopreservação

20

21 **Abstract**

22 The use of semen from 5/8 Girolando bulls is a way to turn available genetic material
23 from a specialized breed in the harshest environments. In this sense, the objective of this study
24 was to analyze the in vitro breeding semen exposed to the same conditions, comparing the
25 changes of semen from the same sample subjected to cooling for a period of 24 hours, 48 hours

1 and freezing. Analyzes of total motility, progressive motility, curvilinear speed and beat cross
2 frequency showed statistical difference between the cooling and freezing treatments, with the
3 bull factor influencing the results of plasma membrane integrity, acrosome membrane potential
4 and chromatin condensation. Among the variables, the integrity of the plasma membrane was
5 the variable that presented the highest correlation with the other studied. The in vitro seminal
6 analyzes of 5/8 Girolando bulls subjected to low temperatures will contribute to the knowledge
7 of standard values for the analyzed variables.

8 Key words: semen, 5/8 Girolando, cryopreservation.

9

10 **Introdução**

11 A biotecnologia, uso ou manipulação de um organismo ou de seus componentes
12 (WETHERINGTON, 2010), quando aplicada na reprodução permite maximizar o uso da
13 genética superior e obter melhores resultados produtivos (CELEGHINI, 2005).

14 Através da criopreservação dos espermatozoides a baixas temperaturas, biotecnologias
15 tiveram um suporte para se desenvolverem (WATSON, 2000). No entanto alterações
16 decorrentes do processo da congelação e pela refrigeração a 5°C (BALL & VO, 2001;
17 WATSON, 2000) justificam estudos mais amplos sobre vários aspectos relacionados à
18 fisiologia da célula espermática e à melhoria dos testes aplicados para analisar a viabilidade dos
19 espermatozoides submetidos à refrigeração, congelação e descongelação, objetivando
20 maximizar os resultados obtidos pelas biotecnologias reprodutivas.

21 Buscando otimização dos sistemas de produção, a seleção do touro ao representar
22 metade da composição genética de sua progênie, também deve receber ênfase e se basear na
23 sua capacidade genética de transmissão de características produtivas e reprodutivas. A escolha
24 de touros mestiços é uma forma de introduzir o material genético de raças especializadas em
25 ambientes tropicais, entretanto, seu uso só será vantajoso após o seu devido conhecimento com

1 posterior aplicação e comprovação de acréscimos nos índices reprodutivos e de produção
2 (SOUZA, 2012).

3 Em 1978, o Programa de Cruzamento Dirigido (PROCRUZA), criado pelo Ministério
4 da Agricultura teve o objetivo de formar uma população bovina sustentável em regiões tropicais
5 e subtropicais, resultante de cruzamentos entre raças de carne e leite. Como resultado, a raça
6 5/8 Girolando mostrou bons resultados e desde então vem tendo reconhecimento nacional e
7 internacional, tornando-se a preferida para produção de leite nas regiões tropicais e sendo a
8 responsável por 80% do leite brasileiro, proporcionando também grandes vantagens
9 socioeconômicas pelas várias alternativas que esse gado propicia (Associação Brasileira de
10 Criadores de Girolando, 2015). No entanto, a relevância que essa raça tem para seus criadores
11 não condiz com os trabalhos técnicos que são esporádicos e escassos.

12 Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi alterações do sêmen da mesma partida
13 submetido a refrigeração (24 e 48 horas) e congelação, às análises seminais de touros expostos
14 às mesmas condições verificando correlações e principalmente, obtenção de valores padrões de
15 análises seminais *in vitro*.

16

17 **Material e métodos**

18 Os reprodutores utilizados neste experimento (n=2) pertencem ao Instituto Agronômico
19 de Pernambuco-IPA com sede em Arcoverde, sertão de Pernambuco, latitude 08°25'08" sul e
20 longitude 37°03'14" oeste, distante 256 km da capital Recife. Os touros com idade de 3 e 4 anos,
21 confinados, submetidos base alimentar silagem de cana de açúcar (3% de proteína) e água *ad*
22 *libitum*. Ambos apresentam fertilidade comprovada em sistema de cobertura natural, passaram
23 por exames andrológicos e foram condicionados a coleta de sêmen via vagina artificial uma vez
24 por semana previamente ao início do experimento.

1 Foram processados no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Animal do IPA-
2 Arcoverde, 11 ejaculados com mais de 70% de motilidade progressiva e vigor 3, diluídos no
3 meio comercial Botu-bov® (Botufarma Ltda, Botucatu, São Paulo, Brasil) para obtenção de
4 numa concentração final de 25×10^6 . Em seguida, cada ejaculado foi envasado em palhetas
5 francesas (0,25ml) e dividido em duas alíquotas, uma foi submetida à conservação a 5° C em
6 refrigerador doméstico com curva de refrigeração de $-1,4^\circ/\text{min C}$ para realização de análises
7 após 24 (SR24) e 48 (SR48) horas de armazenamento e a outra congelada (SC) por meio
8 automatizado (Cryogen®, Neovet, Uberaba, Brasil) com curva de congelação lenta de -5°
9 C/min. Foi definido a refrigeração por 24 horas como tratamento 1, por 48 horas, tratamento 2
10 e a congelação, como tratamento 3.

11 Decorrido o período de armazenamento, para cada ejaculado foi feita a morfologia
12 espermática por meio da câmara úmida (10 μl do sêmen em 1ml de formol salina) avaliando-
13 se 200 espermatozoides em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200, Melville,
14 U.S.A.); a análise da condensação da cromatina por meio do azul de toluidina em dois
15 esfregaços e colocados para secar em temperatura ambiente. Os mesmos passaram um minuto
16 (min) no etanol:ácido acético (3:1), três min no etanol a 70% e posteriormente 25 min em 4M
17 de HCl. Em seguida, lavados em água destilada corrente e secos em temperatura ambiente. Para
18 visualização da condensação da cromatina colocou-se uma gota da solução corante (0,025g do
19 azul de toluidina/1000ml de água destilada, 0,1M de ácido cítrico e 0,2M de Na_2HPO_4) entre a
20 lâmina e lamínula e contados 1000 espermatozoides ao acaso nestas duplicadas com o auxílio
21 de microscópio de campo claro (1000x, Nikon Eclipse E200, Melville, U.S.A). Avaliou-se a
22 porcentagem de células com falha na condensação a partir da visualização de espermatozoides
23 com a cabeça corada de azul escuro a violeta e os normais em azul claro.

24 As avaliações de integridade da membrana plasmática e acrossomal, potencial da
25 membrana mitocondrial e cinética espermática foram feitas no Laboratório de Andrologia

1 (ANDROLAB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, *campus* Recife). Para
2 a análise da integridade da membrana plasmática seguiu a metodologia de SILVA et al. (2013),
3 30 de μl do sêmen foram incubadas com 5 μl de diacetato de carboxifluoresceína (0,46 mg / ml
4 em DMSO) e 5 μl de iodeto de propídeo (0,5 mg / ml em PBS) durante 10 min a 37°C. Um total
5 de 200 espermatozoides foram avaliados através de um microscópio de epifluorescência (Carl
6 Zeiss, Göttingen, Germany) com uma ampliação de 400 \times , usando um filtro de emissão de 580-
7 630 nm DBP e 485-520 nm DBP para excitação. As membranas foram classificadas como
8 intactas quando coradas de verde e danificadas quando coradas de vermelho.

9 Para a integridade acrossômica, seguindo a metodologia de CÂMARA et al. (2011), a
10 partir de alíquotas de 10 μl de sêmen de cada tratamento foram feitos esfregaços e secos em
11 temperatura ambiente. Alíquotas de 30 μl da solução FITC-PNA a 100 $\mu\text{g/mL}$ (1 mg/mL de
12 FITC-PNA e 900 μl de PBS) foram colocadas sobre os esfregaços e incubadas em uma câmara
13 úmida a 4° C por 20 min na ausência da luz. As lâminas foram então imersas em PBS a 4°C e
14 secou-se naturalmente no escuro. Para avaliar, 5 μl de meio de montagem (UCD - 4,5 ml de
15 glicerol, 0,5 ml de PBS e 5 mg p-fenilenodiamina) foram colocadas sobre a lâmina e cobertos
16 com uma lamínula. Duzentos espermatozoides foram examinados com uma ampliação de
17 1000 \times no microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), utilizando um
18 filtro de 515 nm LP de emissão e um filtro 450-490 nm BP para a excitação. Gametas foram
19 classificados como tendo um acrossoma lesionado quando a região equatorial estava corada de
20 verde ou não corava e com acrossoma intacto quando a região acrossomal apresentava-se verde.

21 Na avaliação do potencial da membrana mitocondrial, 30 μl de sêmen foram incubadas
22 com 5 μl de JC-1 (0,15 mM em DMSO) durante 10 min a 37° C. Foram contados 200
23 espermatozoides com microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), com
24 uma ampliação de 400 \times usando filtro de 515 nm LP para emissão e um filtro 450-490 nm BP
25 para a excitação. As células foram classificadas como tendo alto potencial de membrana

1 mitocondrial quando apresentavam a cor na laranja na peça intermediária e quando coradas com
2 verde como tendo baixo potencial (SILVA et al. 2012).

3 Para análise de cinética espermática, as palhetas congeladas e refrigeradas foram
4 inicialmente mantidas em banho-maria a 37° C por 30 segundos. Uma alíquota de 5 µl de sêmen
5 foi colocada sobre uma lâmina previamente aquecida a 37° C e coberta por lamínula para
6 avaliação em um microscópio de contraste de fase (Nikon™ H5505, Eclipse 50i, Tóquio, Japão)
7 e captura das imagens com uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologie™ A312FC,
8 Ahrensburg, Alemanha) numa ampliação de 100x. O mínimo de cinco campos microscópicos
9 não-consecutivos foi aleatoriamente selecionado por amostra e digitalizados, registrando pelo
10 menos 400 espermatozoides móveis. Por meio do sistema CASA (Sperm Class Analyzer- SCA-
11 ™ software v. 5.1, Microptics, S.L. Barcelona, Espanha)

12 A análise estatística foi realizada por meio do programa estatístico SPSS 16.0. Foi
13 realizada a transformação arco seno da raiz quadrada no caso de dados referentes a proporções.
14 Em seguida, calculadas as medidas de tendência central (média±EPM) das variáveis estudadas
15 em resposta aos tratamentos utilizados. As diferenças entre os tratamentos foram testadas pelo
16 método linear de variância (ANOVA) e pelo teste “t” de Student com nível de significância de
17 5%.

18

19 **Resultado e discussão**

20 A motilidade é um dos pré-requisitos necessários para que o espermatozoide conclua
21 seu objetivo de fertilizar o oócito, sendo sua análise umas das mais utilizadas para qualificar o
22 sêmen (VERSTEGEN et al., 2002). No presente trabalho, a motilidade total (MT) e a motilidade
23 progressiva (MP) apresentaram diferenças (P<0,05) quando submetido a congelamento e
24 refrigeração.

1 As características cinéticas dos reprodutores tiveram valores muito próximos, porém
2 algumas das variáveis analisadas apresentaram diferença estatística (tabela 1). No touro 2, foi
3 observado que a amplitude lateral da cabeça (ALH), relação com a fertilização *in vitro*
4 (VERSTEGEN et al., 2002), a linearidade (LIN) e o batimento flagelar cruzado (BCF) que
5 estão relacionados com melhor migração e penetração no muco cervical, (MORTIMER, 2000)
6 mostraram diferenças significantes entre refrigeração e congelação (tabela 2). Esses parâmetros
7 cinéticos no sêmen desse touro mantidos a temperaturas de 5°C, evidenciam características
8 pertinentes a fertilização *in vivo* e *in vitro*.

9 Mesmo utilizando análises computadorizadas para avaliar o movimento espermático,
10 essa metodologia isoladamente não proporciona correlação consistente com os índices de
11 concepção animal, visto que a motilidade é apenas um dos vários pré-requisitos básicos
12 indispensáveis para que os espermatozoides efetivem a fertilização do ovócito (VERSTEGEN
13 et al, 2002). No touro 2, o SR24 apresentou uma maior porcentagem de espermatozoides
14 movimentando-se concomitante a maior quantidade de membranas plasmáticas lesionadas, o
15 que exemplifica a importância de se fazer múltiplas análises.

16 Segundo FARSTAD (2009), durante a criopreservação, alterações na membrana são
17 ocasionadas pela necessidade de adaptação das células espermáticas às mudanças da
18 temperatura e a frequência dessas lesões é proporcional a distribuição da população espermática
19 heterogênea que compõe o sêmen, a qual depende do touro (MUIÑO, 2008). No touro 2, a
20 congelação refletiu em maiores alterações lesivas nas membranas dos espermatozóides quando
21 comparado a refrigeração e as presentes no touro 1.

22 Melhores índices de integridade da membrana plasmática e acrossomal foram
23 observados no sêmen congelado dos touros Girolando 5/8 utilizados nesse trabalho em relação
24 aos dados apresentados por CELEGHINI (2005) em touros Simental e MONTESINOS (2012)
25 em touros Curraleiro/Pé Duro, já VERBERCKMOES et al. (2005) relataram valores superiores

1 em ejaculados refrigerados a 5° C de touros leiteiros na Bélgica mesmo estes tendo sido
2 mantidos por 6 dias.

3 O meio Botu-bov ®, o qual contém glicerol em sua composição, foi utilizado para diluir
4 o sêmen e submetê-lo a refrigeração e congelação. Autores como MOHRI & MASAKI, (1967)
5 afirmam haver um efeito tóxico do glicerol em meios destinados a criopreservação de sêmen,
6 no entanto, nesse experimento, os efeitos nocivos desse crioprotetor não foram observados, uma
7 vez que ejaculados sob refrigeração por dois dias e analisados *in vitro* apresentaram resultados
8 superiores na maioria das variáveis analisadas quando comparado ao congelado.

9 Apesar de constar na literatura os efeitos tóxicos do glicerol, como citado acima, os
10 resultados obtidos por VERBERCKMOES et al. (2005) quando mantiveram o sêmen
11 refrigerado por 6 dias em meio com e sem presença de glicerol não foi constatada diferença nos
12 resultados. É possível que os efeitos nocivos do glicerol sejam decorrentes da interação desse
13 crioprotetor com os demais componentes presentes no diluidor como citado por
14 VISHWANATH & SHANNON (2000).

15 No touro 2, a cromatina mostrou ser a estrutura espermática mais sensível às baixas
16 temperaturas, ao apresentar um aumento gradual de falhas de condensação no intervalo de
17 armazenamento de 24 e 48 horas sob 5°C e quando congelado ($P < 0,05$). Corroborando ANZAR
18 et al. (2002) que observaram que a criopreservação causa falhas na condensação em sêmen de
19 touros da raça Holandesa.

20 Os produtos gerados pelo metabolismo espermático, dentre os quais espécies reativas
21 de oxigênio (ROS), representam um dos principais fatores que levam a inevitável redução na
22 viabilidade espermática ao longo do período de refrigeração (NAIR et al., 2006), ao causar
23 oxidação de proteínas e lesão do DNA espermático (WATSON, 2000). Diante desses aspectos
24 e do aumento gradual observado na falha da condensação da cromatina a medida que o sêmen

1 foi refrigerado e congelado ($P < 0,05$) neste trabalho (touro 2), é plausível especular que as
2 alterações na cromatina possa ser consequência de uma maior produção de ROS.

3 As alterações morfológicas não tiveram um aumento proporcional ao tempo de
4 resfriamento ou congelamento em ambos os touros, mantendo-se acima de 70% em todos os
5 tratamentos.

6 As correlações entre as variáveis ocorreram no T1 entre a IMP e MT (0,98), IMP e MP
7 (0,97), PMM e MT (0,92), IMP e BCF (0,92), e IMP e ALH. No T2, houveram ligações entre
8 o BCF e PMM (0,94), alta correlação entre as MT e MP com a IMP, IMA e PMM ($> 0,96$). IMP
9 revelou a existência de correlação positiva com a integridade da membrana acrossomal,
10 potencial de membrana mitocondrial, ALH, BCF, MT, MP, VCL ($> 0,92$).

11 Na literatura é citada uma correlação alta entre integridade na cromatina e integridade
12 da membrana plasmática (JANUSKAUSKAS et al., 2003). Desse experimento, foi observado
13 uma relação com a compactação da cromatina no T1 (0,89) e contrariamente ao T2, o qual teve
14 uma correlação moderada (0,61).

15 Nos dois touros, a membrana plasmática mostrou ser a variável que mais se correlaciona
16 com as demais estruturas e características do espermatozoide.

17

18 **Conclusão**

19 As alterações impostas no processo de congelação foram superiores àquelas do processo
20 de refrigeração até 48 horas. No entanto houve o efeito touro quanto as variáveis que foram
21 lesionadas durante os tratamentos.

22 As variáveis estudadas se encontram dentro das características seminais preconizadas
23 para reprodutores bovinos e trazem novas informações para a raça 5/8 Girolando.

24

25

1 **Referências**

- 2 ANZAR, M. et al. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow
3 cytometry and its relationship with fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 354–360, 2002.
4 Disponível em:< <http://www.bioreprod.org/content/66/2/354.full.pdf+html>>. Acesso: 22 out.
5 2014.doi:10.1095/bioreprod66.2.354.
- 6 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE GIROLANDO, **Pedra Angular**.
7 Uberaba, 2015. Acessado em: 3 jan.2015. Online. Disponível em: <
8 <http://www.girolando.com.br/index.php?paginasSite/girolando,1,pt>>
- 9 BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble
10 cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential.
11 **Journal of Andrology**, v. 22, p. 1061-1069, 2001. Disponível em:<
12 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2001.tb03446.x/abstract>> Acesso em
13 12 nov. 2014. doi: 10.1002/j.1939-4640.2001.tb03446.x
- 14 CÂMARA, D.R. et al. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on
15 frozen-thawed ram semen, **Theriogenology**, v. 76, p. 342–350.2011. Disponível em:< Effects
16 of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semem>
17 Acesso em 10 jan. 2014. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.02.013
- 18 CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas**
19 **plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides**
20 **utilizando sondas fluorescentes**. 2005.Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Curso de
21 pós-graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/
22 Universidade de São Paulo.
- 23 FARSTAD, W. Cryopreservation of canine semen - new challenges. **Reproduction in**
24 **Domestic Animals**, v. 44, p. 336-341, 2009. Disponível em:

1 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2009.01418.x/epdf>>. Acesso em: 1
2 fev. 2015. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01418.x

3 JANUSKAUSKAS, A. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with
4 sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v.60, p.743-758, 2003.
5 Disponível em:< [http://ac.els-cdn.com/S0093691X03000505/1-s2.0-S0093691X03000505-](http://ac.els-cdn.com/S0093691X03000505/1-s2.0-S0093691X03000505-main.pdf?_tid=4ec4a45e-afd6-11e4-b6fb-00000aab0f27&acdnat=1423429750_8280387bb9f2ef2d1b96204bfa3ac351)
6 [main.pdf?_tid=4ec4a45e-afd6-11e4-b6fb-](http://ac.els-cdn.com/S0093691X03000505-main.pdf?_tid=4ec4a45e-afd6-11e4-b6fb-00000aab0f27&acdnat=1423429750_8280387bb9f2ef2d1b96204bfa3ac351)
7 [00000aab0f27&acdnat=1423429750_8280387bb9f2ef2d1b96204bfa3ac351](http://ac.els-cdn.com/S0093691X03000505/1-s2.0-S0093691X03000505-main.pdf?_tid=4ec4a45e-afd6-11e4-b6fb-00000aab0f27&acdnat=1423429750_8280387bb9f2ef2d1b96204bfa3ac351)>. Acesso em 10
8 set. 2015. doi: 10.1016/S0093-691X(03)00050-5.

9 MOHRI, H.; MASAKI, J. Glycerokinase and its possible role in glycerol metabolism of bull
10 spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.14, p. 179-194. Disponível em: <
11 <http://www.reproduction-online.org/content/14/2/179.long>> Acesso em 11 jan. 2015.
12 doi:10.1530/jrf.0.0140

13 MONTESINOS, I.S. **Avaliação espermática do sêmen criopreservado de touro**
14 **Curraleiro/Pé Duro em banco de germoplasmas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência
15 Animal), Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

16 MORTIMER, S.T. CASA—Practical Aspects. **Journal of Andrology**, v.21, p. 515–524, 2000.
17 Disponível em:< <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x/pdf>>
18 Acesso em: 02 dez. 2014. doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x.

19 MUIÑO, R. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in
20 ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal**
21 **Reproduction Science**, v. 109, p. 27–39, 2008. Disponível em < [http://ac.els-](http://ac.els-cdn.com/S0378432007003375/1-s2.0-S0378432007003375-main.pdf?_tid=63570284-e2a5-11e4-a9f3-00000aab0f01&acdnat=1429016249_01ffa8af0d932f943551b0a4aaceb298)
22 [cdn.com/S0378432007003375/1-s2.0-S0378432007003375-main.pdf?_tid=63570284-e2a5-](http://ac.els-cdn.com/S0378432007003375/1-s2.0-S0378432007003375-main.pdf?_tid=63570284-e2a5-11e4-a9f3-00000aab0f01&acdnat=1429016249_01ffa8af0d932f943551b0a4aaceb298)
23 [11e4-a9f3-00000aab0f01&acdnat=1429016249_01ffa8af0d932f943551b0a4aaceb298](http://ac.els-cdn.com/S0378432007003375/1-s2.0-S0378432007003375-main.pdf?_tid=63570284-e2a5-11e4-a9f3-00000aab0f01&acdnat=1429016249_01ffa8af0d932f943551b0a4aaceb298)>.

24 Acesso em: 3 dez. 2014. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.10.007

1 NAIR, S.J. et al. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes
2 and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature.
3 **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 21–29, 2006. Disponível em: < [http://ac.els-](http://ac.els-cdn.com/S0378432005003490/1-s2.0-S0378432005003490-main.pdf?_tid=8d737c2c-bdc1-11e4-9905-00000aab0f27&acdnat=1424960152_f8ccb2e6dd476168c3452d84959eb0d1)
4 [cdn.com/S0378432005003490/1-s2.0-S0378432005003490-main.pdf?_tid=8d737c2c-bdc1-](http://ac.els-cdn.com/S0378432005003490/1-s2.0-S0378432005003490-main.pdf?_tid=8d737c2c-bdc1-11e4-9905-00000aab0f27&acdnat=1424960152_f8ccb2e6dd476168c3452d84959eb0d1)
5 [11e4-9905-00000aab0f27&acdnat=1424960152_f8ccb2e6dd476168c3452d84959eb0d1](http://ac.els-cdn.com/S0378432005003490/1-s2.0-S0378432005003490-main.pdf?_tid=8d737c2c-bdc1-11e4-9905-00000aab0f27&acdnat=1424960152_f8ccb2e6dd476168c3452d84959eb0d1)>
6 Acesso em: 1 dez. 2014. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.11.002.

7 SILVA, E.C.B. et al. In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or
8 acetamide. **Animal Reproductiona Science**, v.132, p.155–158, 2012. Disponível em: <
9 [http://ac.els-cdn.com/S037843201200156X/1-s2.0-S037843201200156X-](http://ac.els-cdn.com/S037843201200156X/1-s2.0-S037843201200156X-main.pdf?_tid=f4a81e02-c118-11e4-831d-00000aab0f26&acdnat=1425327545_7c9f7d7958176ebda2ae8703c4037d3f)
10 [main.pdf?_tid=f4a81e02-c118-11e4-831d-](http://ac.els-cdn.com/S037843201200156X/1-s2.0-S037843201200156X-main.pdf?_tid=f4a81e02-c118-11e4-831d-00000aab0f26&acdnat=1425327545_7c9f7d7958176ebda2ae8703c4037d3f)
11 [00000aab0f26&acdnat=1425327545_7c9f7d7958176ebda2ae8703c4037d3f](http://ac.els-cdn.com/S037843201200156X/1-s2.0-S037843201200156X-main.pdf?_tid=f4a81e02-c118-11e4-831d-00000aab0f26&acdnat=1425327545_7c9f7d7958176ebda2ae8703c4037d3f). Acesso em 10
12 jan. 2015. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.05.014.

13 SILVA, V. S. et al. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram
14 spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**,
15 v.137, p.37-44, 2013. Disponível em: <
16 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432012003892>>. Acesso em: 04 jan.
17 2015. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.12.002.

18 SOUZA, R.R.C de P. **Efeitos ambientais e de grupos genéticos sobre características de**
19 **produção de sêmen em touros mestiços (Bos taurus x Bos indicus)**. 2012. Dissertação
20 (Mestre em Produção Animal Sustentável) - Curso de pós-graduação em Produção Animal
21 Sustentável, Agência Paulista de Tecnologia em Agronegócios.

22 VERBERCKMOES, S. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen
23 **Theriogenology**, v. 63, p. 912,922. 2005. Disponível em:< [http://ac.els-](http://ac.els-cdn.com/S0093691X04001633/1-s2.0-S0093691X04001633-main.pdf?_tid=65c0b65e-afcf-)
24 [cdn.com/S0093691X04001633/1-s2.0-S0093691X04001633-main.pdf?_tid=65c0b65e-afcf-](http://ac.els-cdn.com/S0093691X04001633/1-s2.0-S0093691X04001633-main.pdf?_tid=65c0b65e-afcf-)

1 11e4-9dc4-0000aacb361&acdnat=1423426782_1a11c5c6cc251bc1d30d91760dd1f88d>.
2 Acesso em: 11 nov. 2014. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.05.011.
3 VERSTEGEN, J. et al. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary
4 practice. **Theriogenology**, v. 57, p.149-179, 2002. Disponível em:< [http://ac.els-](http://ac.els-cdn.com/S0093691X01006641/1-s2.0-S0093691X01006641-main.pdf?_tid=f627ef68-afc1-11e4-b0bb-0000aacb35d&acdnat=1423421012_b674abfe99fae6c9fdb0647bb446baa4)
5 [cdn.com/S0093691X01006641/1-s2.0-S0093691X01006641-main.pdf?_tid=f627ef68-afc1-](http://ac.els-cdn.com/S0093691X01006641/1-s2.0-S0093691X01006641-main.pdf?_tid=f627ef68-afc1-11e4-b0bb-0000aacb35d&acdnat=1423421012_b674abfe99fae6c9fdb0647bb446baa4)
6 [11e4-b0bb-0000aacb35d&acdnat=1423421012_b674abfe99fae6c9fdb0647bb446baa4](http://ac.els-cdn.com/S0093691X01006641/1-s2.0-S0093691X01006641-main.pdf?_tid=f627ef68-afc1-11e4-b0bb-0000aacb35d&acdnat=1423421012_b674abfe99fae6c9fdb0647bb446baa4)>
7 Acesso em: 02 out. 2014. doi:10.1016/S0093-691X(01)00664-1.
8 VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state.
9 **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000. Disponível em:< [http://ac.els-](http://ac.els-cdn.com/S0378432000001536/1-s2.0-S0378432000001536-main.pdf?_tid=3828e648-e248-11e4-b3b7-0000aacb35e&acdnat=1428976233_6f37b0632d594546b414490c3552c312)
10 [cdn.com/S0378432000001536/1-s2.0-S0378432000001536-main.pdf?_tid=3828e648-e248-](http://ac.els-cdn.com/S0378432000001536/1-s2.0-S0378432000001536-main.pdf?_tid=3828e648-e248-11e4-b3b7-0000aacb35e&acdnat=1428976233_6f37b0632d594546b414490c3552c312)
11 [11e4-b3b7-0000aacb35e&acdnat=1428976233_6f37b0632d594546b414490c3552c312](http://ac.els-cdn.com/S0378432000001536/1-s2.0-S0378432000001536-main.pdf?_tid=3828e648-e248-11e4-b3b7-0000aacb35e&acdnat=1428976233_6f37b0632d594546b414490c3552c312)>.
12 Acesso em: 12 dez. 2015. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00153-6.
13 WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal**
14 **Reproduction Science**, v.60-61, p. 481-492. 2000. Disponível em: < [http://ac.els-](http://ac.els-cdn.com/S0378432000000993/1-s2.0-S0378432000000993-main.pdf?_tid=985d9268-afb5-11e4-b54d-0000aacb35e&acdnat=1423415700_5a3b52907f9274390f321ae76fa25636)
15 [cdn.com/S0378432000000993/1-s2.0-S0378432000000993-main.pdf?_tid=985d9268-afb5-](http://ac.els-cdn.com/S0378432000000993/1-s2.0-S0378432000000993-main.pdf?_tid=985d9268-afb5-11e4-b54d-0000aacb35e&acdnat=1423415700_5a3b52907f9274390f321ae76fa25636)
16 [11e4-b54d-0000aacb35e&acdnat=1423415700_5a3b52907f9274390f321ae76fa25636](http://ac.els-cdn.com/S0378432000000993/1-s2.0-S0378432000000993-main.pdf?_tid=985d9268-afb5-11e4-b54d-0000aacb35e&acdnat=1423415700_5a3b52907f9274390f321ae76fa25636)>.
17 Acesso em: 03 out. 2014. doi:10.1016/S0378-4320(00)00099-3.
18 WETHERINGTON, J. **Introduction to Biotechnology: A Georgia Teachers Resource**
19 **Manual**. 2014. Acessado em 20 jan. 2015. Online. Disponível em: <
20 [https://www.gadoe.org/Curriculum-Instruction-and-Assessment/CTAE/Documents/Teachers-](https://www.gadoe.org/Curriculum-Instruction-and-Assessment/CTAE/Documents/Teachers-Guide-Biotechnology-GaBIO.pdf)
21 [Guide-Biotechnology-GaBIO.pdf](https://www.gadoe.org/Curriculum-Instruction-and-Assessment/CTAE/Documents/Teachers-Guide-Biotechnology-GaBIO.pdf)

22

23 **Agradecimentos**

24 Ao Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) pelo apoio a pesquisa fornecendo espaço e
25 animais e a CAPES pela bolsa de estudo que ajudou na execução do projeto de pesquisa.

Tabela 1: Análises cinéticas e morfofuncionais de touro da raça 5/8 Girolando (touro 1).

Variáveis	Formas de conservação			
	T 1	SR 24	SR48	SC
MT		63,37±1,49 ^a	63,21±4,63 ^a	40,24±6,19 ^b
MP		50,93±3,3 ^a	51,93±3,3 ^a	28,77±4,2 ^b
VCL		71,95±5,25 ^a	84,73±3,61 ^b	55,75±5,79 ^a
VSL		45,27±1,91 ^{a,b}	50,79±3,37 ^{a,c}	35,37±3,63 ^b
VAP		53,32±3,24 ^a	59,87±2,61 ^a	42,30±4,87 ^a
LIN		52,71±1,45 ^a	49,16±4,2 ^a	52,85±0,97 ^a
STR		67,34±1,49 ^a	67,08±1,94 ^b	67,08±1,94 ^b
WOB		60,02±4,06 ^a	57,41±2,45 ^a	60,51±1,32 ^a
ALH		2,55±0,21 ^a	2,77±0,24 ^a	2,24±0,14 ^a
BCF		12,06±0,9 ^{a,b}	13,66±0,24 ^{a,c}	11,00±0,35 ^b
IMP		58,19±2,77 ^a	54,1±6,93 ^a	39,2±2,21 ^a
IMA		59,34±11,88 ^a	60,65±10,42 ^a	57,78±6,22 ^a
PMM		63,04±4,66 ^a	65,73±6,39 ^a	55,19±4,33 ^a
CC		80,52±0,62 ^a	80,20±0,34 ^a	79,55±0,89 ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

SR24- Sêmen refrigerado por 24 horas; SR48-Sêmen refrigerado por 48 horas; SC- Sêmen congelado; MT- Motilidade total; MP- Motilidade progressiva; VCL- Velocidade curvilínea; VSL- Velocidade linear progressiva; VAP- Velocidade média da trajetória; LIN- Linearidade; STR- Retilinearidade; WOB- Oscilação; ALH- Amplitude lateral da cabeça; BCF- Batimento flagelar cruzado; IMP- Integridade da membrana plasmática; IMA- Integridade da membrana acrossomal; PMM- Potencial da membrana mitocondrial; CC- Condensação da cromatina

Tabela 2: Análises cinéticas e morfofuncionais de touro da raça 5/8 Girolando (touro 2).

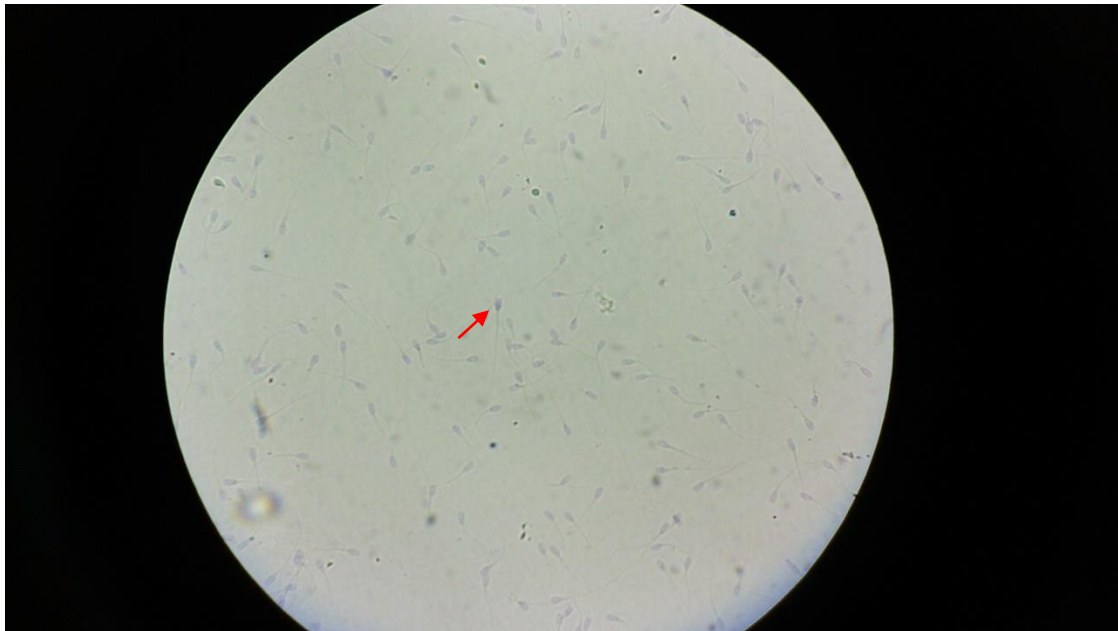
Variáveis T 2	Formas de conservação		
	SR 24	SR48	SC
MT	65,56±3,02 ^a	65,5±2,52 ^a	38,83±5,4 ^b
MP	48,12±2,16 ^a	47,05±3,22 ^a	28,97±4,43 ^b
VCL	91,28±8,31 ^a	92,23±8,34 ^a	62,36±7,26 ^b
VSL	58,91±6,14 ^a	53,88±2,75 ^a	45,75±6,41 ^a
VAP	74,24±9,02 ^a	71,13±6,15 ^a	54,06±7,33 ^a
LIN	53,36±1,17 ^a	50,9±1,88 ^a	58,02±1,52 ^b
STR	63,99±1,17 ^a	61,98±2,13 ^a	66,56±0,7 ^a
WOB	64,07±2,43 ^a	61,9±1,59 ^a	67,58±1,83 ^a
ALH	2,54±0,11 ^a	2,84±0,23 ^a	1,7±0,09 ^b
BCF	10,98±0,95 ^a	11,24±0,47 ^a	8,14±0,5 ^b
IMP	49,29±2,31 ^a	51,65±1,77 ^a	32,40±2,78 ^b
IMA	67,65±2,88 ^a	68,80±2,36 ^a	63,86± 3,03 ^a
PMM	54,47±4,8 ^a	45,88±9,48 ^{a,c}	23,07±8,24 ^{b,c}
CC	81,33±0,37 ^a	79,13±0,81 ^b	78,66±0,7 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05)

SR24- Sêmen refrigerado por 24 horas; SR48-Sêmen refrigerado por 48 horas; SC- Sêmen congelado; MT- Motilidade total; MP- Motilidade progressiva; VCL- Velocidade curvilínea; VSL- Velocidade linear progressiva; VAP- Velocidade média da trajetória; LIN- Linearidade; STR- Retilinearidade; WOB- Oscilação; ALH- Amplitude lateral da cabeça; BCF- Batimento flagelar cruzado; IMP- Integridade da membrana plasmática; IMA- Integridade da membrana acrossomal; PMM- Potencial da membrana mitocondrial; CC- Condensação da cromatina

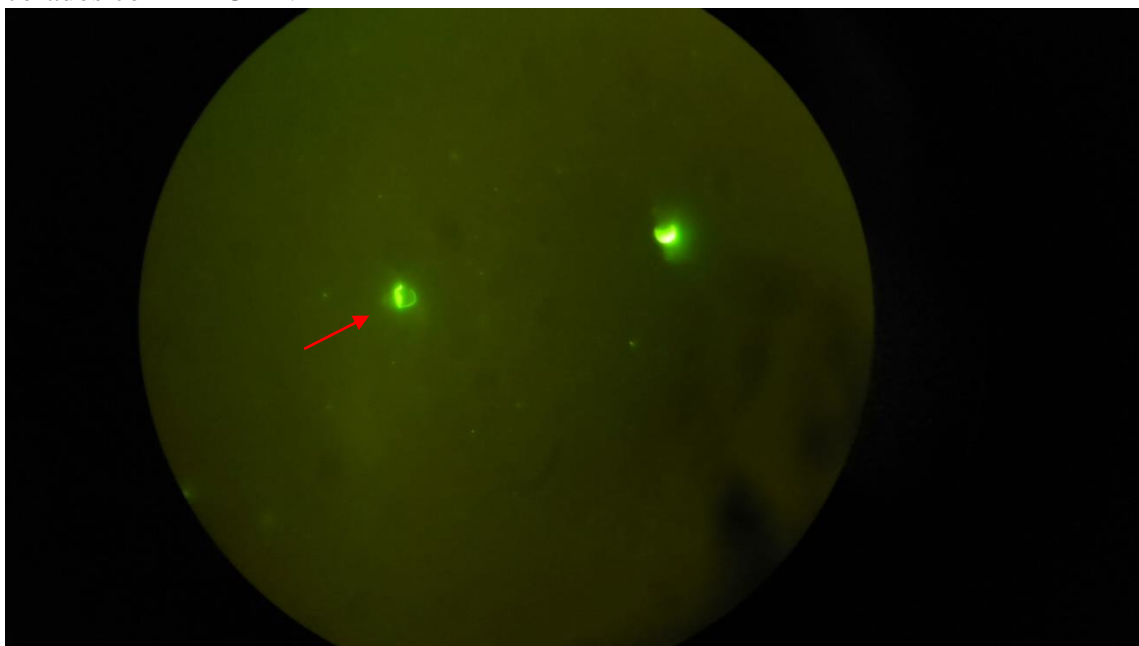
6. APÊNDICE

6.1. APÊNDICE A- Espermatozoides corado com azul de toluidina



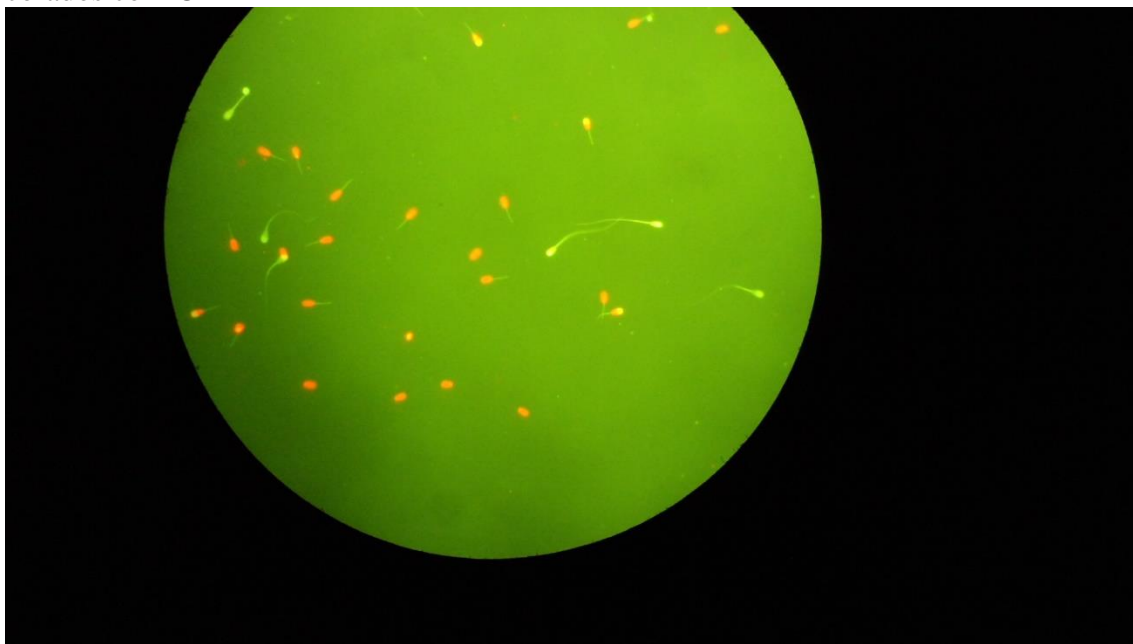
Seta indica espermatozoide com falha na condensação

6.2. APÊNDICE B- Espermatozoides visualizados por microscópio de epifluorescência corados com FITC-PNA



Espermatozoide com seta mostra membrana acrossomal lesada

6.3. APÊNDICE C- Espermatozoides visualizados por microscópio de epifluorescência corados com CFDA-IP



Espermatozoides corados de vermelho, apresentam membrana plasmática danificada e de verde intactas

7. ANEXO A - Normas para publicação da revista *Ciência Rural*

Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências;

Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

4. A revisão bibliográfica (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

5. A nota (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:
JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:
GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:
 COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York: John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.
 TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo: Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:
 O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:
 RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:
 COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:
 ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo: Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:
 Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:
 MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico.** São Paulo: Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos.** Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: [http://www. Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm](http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm)

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

17. Todos os artigos encaminhados devem pagar a taxa de tramitação. Artigos reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de tramitação novamente