



TEMPOS DE INCUBAÇÃO DE AMOSTRAS DE SÊMEN BOVINO EM TESTE DE TERMORRESISTÊNCIA (TTR)

Guilherme Vechiato **Benvenuto**¹; Heloisa Coelho **Ferreira**²; Marcelo Sant'Ana **Borges**³; Letícia Padovani da Silva⁴; Fabio Morato **Monteiro**⁵

Nº 22704

RESUMO – O teste de termorresistência (TTR) avalia a resistência dos espermatozoides em temperaturas altas por um curto período (teste de termorresistência rápido – TTRR) ou em temperatura fisiológica da vaca por um período de incubação maior (teste de termorresistência lento – TTRL). O objetivo do presente estudo foi comparar a viabilidade do sêmen de touros da raça Nelore entre diferentes temperaturas e tempos de incubação no teste de termorresistência. Foram utilizadas 32 partidas diferentes de 4 touros da raça Nelore. As amostras de sêmen foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e posteriormente incubadas em palhetas fechadas por 30, 45 e 60 minutos a temperatura de 46°C e 3, 5 e 8 horas em temperatura de 38°C. Posteriormente a cada período de incubação, as amostras foram analisadas utilizando sistema computadorizado de análise espermática (CASA) e integridade de membrana plasmática pelo teste hiposmótico. As análises dos resultados foram avaliadas utilizando o pacote estatísticos do SAS. As médias de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) dos tempos do TTRL foram superiores às médias do TTRR, indicando maior resistência dos espermatozoides quando expostos mais próximos à temperatura fisiológica dos bovinos. No TTRL foi observado padrão de movimentação de hiperativação espermática (alto valores para VCL e ALH). O TTRL apresentou melhor integridade de membrana plasmática comparado ao TTRR, em que a temperatura do TTRR pode ter comprometido a membrana dos espermatozoides. Desta forma, foi concluído que o TTRL causou menos danos à integridade da membrana celular e apresentou os melhores resultados de cinética espermática.

Palavras-chaves: *Bos indicus*, Nelore, CASA, viabilidade espermática, integridade espermática.

1 Guilherme Vechiato Benvenuto, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, UNESP-FCAV, Jaboticabal-SP; guilhermevechiato@gmail.com

2 Heloisa Coelho Ferreira – Pós-Graduação (mestrado) em Ciências Veterinárias Setor de Reprodução Animal, UNESP-FCAV, Jaboticabal-SP.

3 Marcelo Sant'Anna Borges - Pós-Graduação (doutorado) em Ciências Veterinárias Setor de Reprodução Animal, UNESP-FCAV, Jaboticabal-SP.

4 Letícia Padovani da Silva – Pós-Graduação (mestrado) em Produção Animal Sustentável do Instituto de Zootecnia – Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Bovinos de Corte, Sertãozinho-SP.

5 Fabio Morato Monteiro - Pesquisador do Instituto de Zootecnia – Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Bovinos de Corte, Sertãozinho-SP; fabio.monteiro@sp.gov.br



ABSTRACT – *The Thermoresistance Test (TT) evaluates sperm resistance at high temperatures for a short period (Rapid Thermoresistance Test – RTT) or at physiological cow temperature for a longer incubation period (Slow Thermoresistance Test – STT). The aim of the study was to compare the semen quality of Nelore bulls between different thermoresistance techniques and times. 32 different matches of 4 Nelore bulls were used. Semen samples were thawed at 37°C for 30 seconds and subsequently incubated in closed straws for 30, 45 and 60 minutes at 46°C and 3, 5 and 8 hours at 38°C. Semen samples were evaluated in all periods using a Computer Sperm Analysis System (CASA) and plasma membrane integrity by hypoosmotic test. Outcome analyzes were evaluated using the SAS statistical package. The Total Motility (TM) and Progressive Motility (PM) averages of the STT times were higher than the RTT averages, indicating greater resistance of sperm when exposed closer to the physiological cattle temperature. In STT, greater sperm hyperactivation was detected compared to RTT and post-thawing. STT showed better plasma membrane integrity compared to all times of RTT, which the temperature of RTT may have damaged the sperm membrane. Thus, it is concluded that STT obtained better results for motility and caused less damage to the cell membrane integrity compared to RTT.*

Keywords: *Bos indicus*, Nelore, reproduction, CASA, sperm viability, sperm integrity.

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é uma prática essencial para o Brasil, tanto no âmbito econômico quanto social, pois existe demanda mundial por alimentos de boa qualidade, sustentabilidade e socialmente responsáveis, sendo o país competitivo no mercado agropecuário externo, caracterizado pelo potencial e desenvolvimento tecnológico para produção animal (Vianna et al., 2009). Entre as tecnologias que ganham espaço na pecuária nacional, estão aquelas relacionadas à reprodução e ao melhoramento genético, como a inseminação artificial (IA) e inseminação artificial a tempo fixo (IATF). Essas representam procedimentos biotecnológicos descomplicados, que utilizam o sêmen bovino, e que são realizadas para melhorar as taxas de reprodução e genética do rebanho (Emerick et al., 2011).

Para que as biotécnicas da reprodução que envolvem a inseminação artificial sejam eficientes, é necessário obter o conteúdo espermático e genético de qualidade, selecionando criteriosamente os reprodutores doadores de sêmen e manipulando o conteúdo espermático cuidadosamente para produção do material que será armazenado (Arruda et al., 2004). Por isso,

existe ampliação de estudos sobre testes laboratoriais que buscam avaliar acurácia e desempenho de amostras de sêmen, com objetivo de desenvolver ainda mais as técnicas reprodutivas no campo (Siqueira, 2007). Em análises do sêmen *in vitro*, para testar a viabilidade e qualidade do sêmen são realizadas as avaliações laboratoriais, que estimam o potencial de fertilidade, como a motilidade espermática, concentração espermática, anormalidade espermática e o teste de termorresistência (TTR), este último que induz as células espermáticas ao estresse térmico (Arruda, et al., 2004). No TTR, são realizadas provas de exaustão dos espermatozoides submetidos à diversas temperaturas, o que pode mimetizar a capacidade destas células resistirem aos longos períodos em determinada temperatura para a fertilização *in vivo* (Vianna et al., 2009; Borges-Silva et al., 2015). Dimitropoulos (1967) desenvolveu, primeiramente, o que ficou conhecido como teste de termorresistência lento (TTRL), em que incubou amostras de sêmen por 5 horas em 38°C, e posteriormente, procurou realizar o mesmo teste de maneira mais rápida, incubando o sêmen a 46°C 30 minutos, que se denominou teste de termorresistência rápido (TTRR), e em ambos os testes era verificada motilidade espermática após o período de incubação. Os resultados de motilidade após o teste de termorresistência são de grande importância para determinar a qualidade da partida do sêmen, pois ele determina a integridade dos espermatozoides em condições parecidas com a inseminação artificial (IA), e assim, possibilitar sua venda (Tallini, 2019).

Diante do exposto, se faz necessário mais estudos que abordem a aplicabilidade dos testes de termorresistência, desde qual utilizar (rápido e lento) como o tempo de incubação para realização dos testes. Por isso, o objetivo do presente estudo foi comparar a viabilidade do sêmen de touros da raça Nelore entre diferentes temperaturas e tempos de incubação no teste de termorresistência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste experimento foram confrontados três períodos de incubação de sêmen em dois diferentes ambientes de estresse térmico.

Foram avaliadas 8 partidas diferentes de sêmen congelado de 4 animais da raça Nelore (*Bos indicus*), totalizando 32 partidas de sêmen. As partidas de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Após a descongelação, a cinética espermática da amostra de sêmen foi avaliada pelo CASA (Computer Analysis System evaluation / análise computadorizada de movimento espermático) e a integridade de membrana plasmática pelo teste hiposmótico. Essas análises tiveram como objetivo servir como controle e parâmetro

comparativo para as análises após os períodos de incubação nos testes de termorresistência rápido (TTRR) e teste termorresistência lento (TTRL).

Foram incubadas simultaneamente três partidas iguais de sêmen em “banho-maria” a 46°C por 30, 45 e 60 minutos para avaliar o TTRR e da mesma forma foram incubadas três partidas iguais de sêmen a 38°C por 3, 5 e 8 horas para avaliar o TTRL (Figura 1).

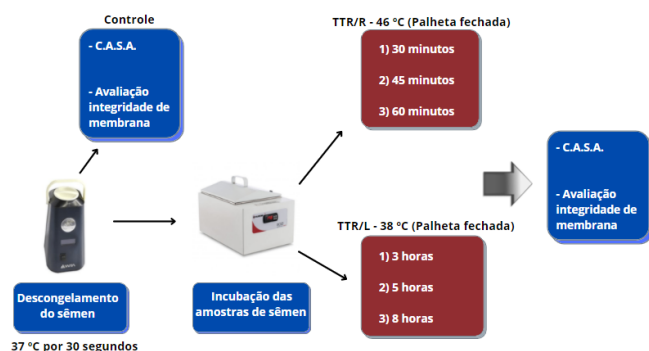


Figura 1. Delineamento experimental do projeto.

Após o período de incubação dos TTR as amostras foram submetidas à análise pelo CASA (Hamilton Thorne Research, IVOS-14, EUA). Para tanto, 10 µL da amostra do sêmen foram colocados na câmara de Makler (SEFI Medical Instruments Ltda®, Haifa, Israel) previamente aquecida (38°C), sendo observados cinco campos aleatórios e, no mínimo, 150 espermatozoides por campo. Os parâmetros utilizados foram: Motilidade total (MT, %); Motilidade progressiva (MP, %); Porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP, %); Velocidade média de trajeto (VAP, µm/s); Velocidade em linha reta (VSL, µm/s); Velocidade curvilinear (VCL, µm/s); Amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, µm); Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz); Progressividade (STR, %); Linearidade (LIN, %).

O teste hiposmótico foi realizado depositando-se 20 µL de sêmen em 1 mL de solução hiposmótica (100 mOsm; REVELL & MRODE, 1994) a 37°C durante 60 minutos. Após esse período, uma alíquota de 10 µl do sêmen diluído na solução hiposmótica foi colocada entre lâmina e lamínula e avaliada por microscopia de contraste de fase. Os espermatozoides foram classificados quanto a presença ou não de cauda enrolada. Foram avaliados 200 espermatozoides em aumento de 400X. A porcentagem de espermatozoides viáveis foi calculada de acordo com REVELL & MRODE (1994).

Os resultados de todas as análises de sêmen foram submetidos análise de variância, pelo procedimento MIXED (SAS, Versão 9.4), utilizando medidas repetidas no tempo. As médias foram ajustadas pelo método dos quadrados mínimos (“LSMEANS”) e comparadas,

quando necessário, por meio da probabilidade da diferença (“PDIFF”), usando teste “t”. A diferença estatística foi declarada quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias da motilidade total (MT, %) e motilidade progressiva (MP, %), porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP, %), e teste hiposmótico (TH, %) estão apresentadas na Figura 2.

A MT, que mensura a porcentagem de células móveis na amostra, diminuiu em todos os períodos em ambos os testes de TTR em relação ao controle (avaliação pós-descongelamento), única exceção foi TTRL de 3 horas que os valores foram similares. Isto ocorre, devido a diminuição do metabolismo celular conforme o tempo de incubação aumenta, quando a célula espermática recupera sua função após descongelamento, ocorre consumo de nutrientes presentes no meio de conservação, assim, produz metabólitos e reduz a disponibilidade de nutrientes (TALLINI et. al., 2019).

O tempo controle, logo após a descongelação, apresentou valores superiores de MT em relação aos testes de termorresistência rápidos e lentos. No entanto, quando foi comparado os valores de MT entre os testes, as médias dos tempos do TTRL foram superiores às médias do TTRR, indicando que os espermatozoides tiveram maior resistência quando expostos mais próximos à temperatura fisiológica dos bovinos (38 °C) por tempos prolongados de 3, 5 e 8 horas (VERSTEGEN et. al., 2002). Isto pode ter ocorrido, porque o TTRR é mais agressivo em suas condições de temperatura (46 °C), que são maiores que as condições fisiológicas do animal, causando efeitos negativos à motilidade do semen bovino (VIANNA et. al., 2009). Tallini et. al. (2019) obtiveram resultados de motilidade maiores para TTRL em relação ao TTRR, porém somente para o TTRL que foi realizado por apenas uma hora, enquanto o TTRL de 3 horas não diferiu do TTRR de 30 minutos, diferente do presente estudo, em que todos os tempos de TTRL (3, 5 e 8 horas) foram superiores à todos os tempos de TTRR (30, 45 e 60 minutos).

Por outro lado, Cunha et. al. (2012) observaram resultados de MT superiores para o TTR de 30 minutos a 46°C em relação ao TTR de 5 horas a 38 °C, embora as análises de MT foram feitas subjetivamente sem o uso de análise computadorizada (CASA), e os autores sugeriram que a diferença encontrada ocorre, pois, o TTRL compromete os parâmetros de motilidade devido ao maior tempo de incubação da amostra, que não condiz com os achados nesse experimento. De forma similar aos resultados observados para MT, tanto a motilidade progressiva (MP) quanto a porcentagem de células rápidas (RAP) avaliadas pelo CASA apresentaram resultados superiores

no TTR lento comparado ao teste rápido. O TTRL apresentou valores superiores para MP em todos os tempos avaliados quando comparado ao TTRR, somente os valores do TTRL de 8 horas e o TTRR de 30 minutos foram similares.

De acordo com Muiño et. al. (2008), o perfil dos espermatozoides quanto sua velocidade é dinâmico, em que a velocidade muda de acordo com a condição a que o espermatozoide é submetido. Neste estudo, para o TTRL de 3 horas, manteve-se o padrão parecido com o tempo controle de pós descongelação, que foi rápido e progressivo, enquanto a temperatura do TTRR para todos os tempos tornou os espermatozoides, em sua maioria, lentos e não progressivos, possivelmente pelo fato que, nesta condição de temperatura (46 °C) ocorre rápido aumento do metabolismo celular e, conseqüentemente, maior gasto de energia do espermatozoide, além de lesões na membrana celular ou alterações em seu mecanismo osmótico (SUAREZ, 2008; ROTA et. al., 2000).

Para o teste hiposmótico (TH), o controle e o TTRL de 3 horas apresentaram maiores médias de células com cauda enrolada, o que indica que o TTRL de 3 horas foi o que obteve integridade de membrana maior e mais próximo do sêmen pós descongelação. Ainda, todos os TTRL tiveram médias maiores de células com enrolamento de cauda comparado a todos os tempos do teste rápido. Essa diferença ocorreu, possivelmente, porque o tempo de exposição da célula espermática à temperatura de 46°C prejudicou a atividade bioquímica da membrana plasmática da célula, sobretudo na atividade da bomba de sódio e potássio, responsável pelo equilíbrio osmótico celular, permitindo a entrada e saída de água dentro da célula pela membrana, o que impossibilita o equilíbrio osmótico (CORREA & ZAVOS, 1994). O mesmo pode-se supor com relação ao TTRL de 5 e 8 horas, os quais ficaram muito tempo expostos à temperatura de 38°C e tiveram comprometimento da membrana plasmática (ROTA et. al., 2000).

Siqueira et. al. (2007), em seu trabalho relataram média superior de motilidade progressiva em relação ao número de células reativas ao teste hiposmótico em semen submetido ao teste de termorresistência lento de 3 horas, o que indicaria presença células móveis, porém sem membrana plasmática íntegra. No presente estudo, para todos os tempos de teste de termorresistência, inclusive o teste de termorresistência lento de 3 horas, a porcentagem de células reativas ao teste hiposmótico apresentaram o mesmo padrão dos resultados que a motilidade total e progressiva, isto é, o teste de termorresistencia em temperatura mais elevada (46°C) lesionou maior porcentagem de espermatozoides em relação ao teste com temperatura à 38°C (Figura 2). De acordo com Watson (2005), embora o declínio da motilidade espermática pode ser explicado por alterações no transporte ativo e na permeabilidade da membrana plasmática da região da cauda dos espermatozóides, é possível também que alterações na energia disponível ou danos aos

elementos do axonema contribuem para o declínio da MP, o que resulta em baixa motilidade, sem alto índice de lesão da membrana plasmática, e por isso pode ser notado presença de células imóveis e funcionalmente íntegras, o que pode ser uma explicação para o achado neste estudo.

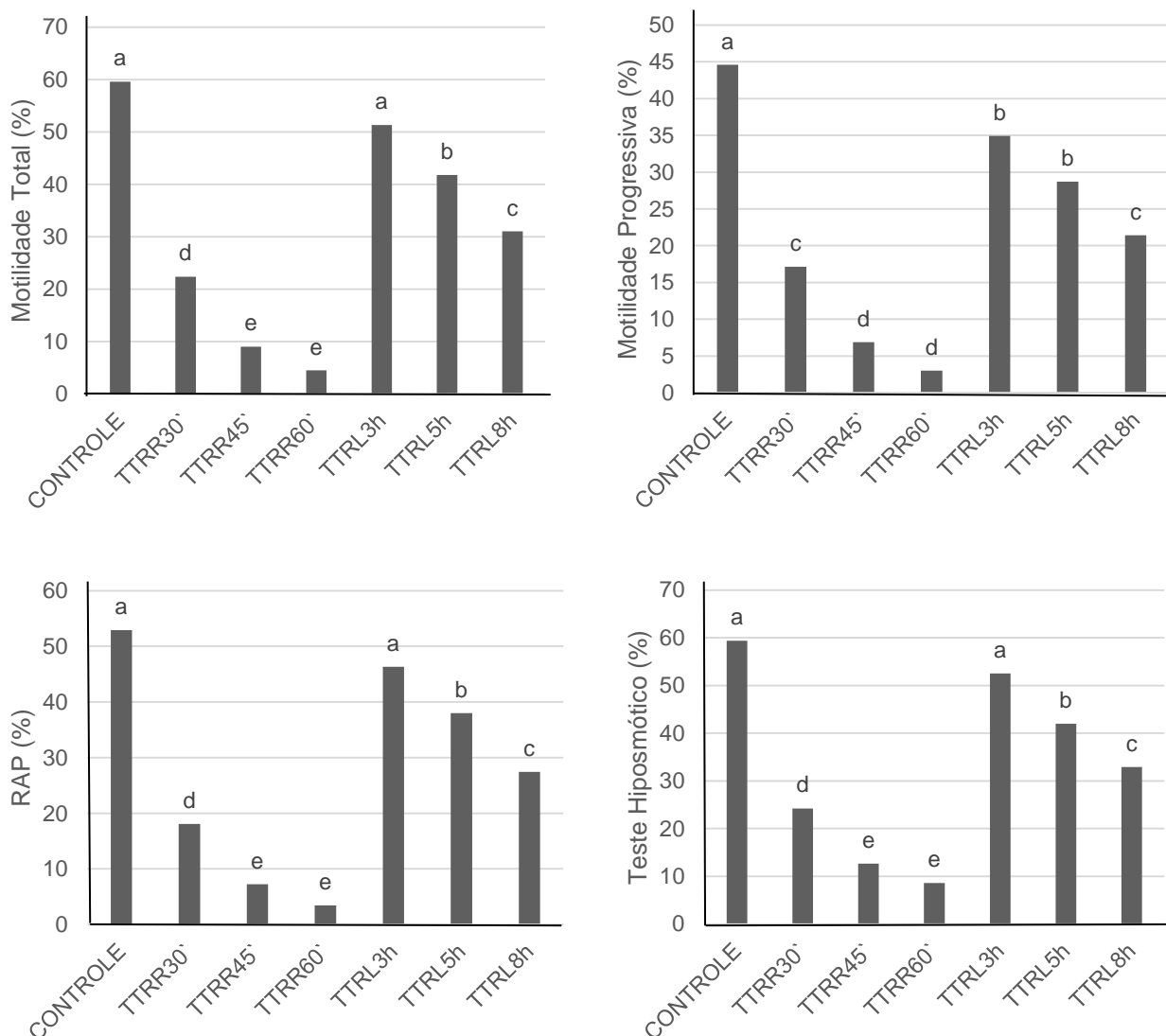


Figura 2. Variáveis avaliadas pelo CASA por tempo de incubação e teste de termorresistencia (rápido ou lento). MT (motilidade total, %), MP (motilidade progressiva, %), RAP (velocidade rápida, %) e TH (teste hiposmótico, %). Tempos de testes de termorresistência: Controle (momento pós-descongelação a 37°C), TTRR30' (teste de termorresistência rápido de 30 minutos), TTRR45' (teste de termorresistência rápido de 45 minutos), TTRR60' (teste de termorresistência rápido de 60 minutos), TTTL3h (teste de termorresistência lento de 3 horas), TTTL5h (teste de termorresistência lento de 5 horas) e TTTL8h (teste de termorresistência lento de 8 horas).

Na tabela 1 estão apresentadas as médias de velocidade média de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz), progressividade (STR, %) e linearidade (LIN, %), analisadas por tempo de incubação e teste de termorresistencia (rápido ou lento).

As variáveis da cinética espermática analisadas pelo CASA são importantes para avaliar o perfil de movimentação dos espermatozoides, assim como a hiperativação espermática. O evento de hiperativação espermática deve acontecer quando o espermatozoide se encontra nas tubas uterinas para que se desprendam do muco tubárico (SUAREZ, 2008). De uma maneira geral, as variáveis VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR e LIN apresentaram valores superiores quando foi utilizado o teste de termorresistencia lento na temperatura de 38°C, inclusive apresentando valores similares aos pós descongelamento (controle). Por outro lado, os valores apresentados pelo teste de termorresistente rápido (46°C) por 30, 45 e 60 minutos apresentaram, na maioria das avaliações, menores valores para todas as variáveis fornecidas pelo CASA, demonstrando que o teste de termorresistência utilizando temperatura de 46°C prejudicou a movimentação do espermatozoide.

De acordo com Marquez & Suarez et. al. (2006), os espermatozoides bovinos hiperativados exibem movimentações lateralizadas, compondo um padrão de “formato de estrela” ou “forma de 8”, e geralmente apresentam altos valores de VCL e ALH e baixa LIN, simultaneamente. Neste estudo, a análise computadorizada do sêmen nos tempos de TTRL apresentou indicações de hiperativação espermática para os tempos de TTRL, porém não foi detectado os mesmos indícios nos tempos de TTRR, possivelmente porque, em maior temperatura, os espermatozoides se hiperativam precocemente (antes de 30 minutos), resultando em maior gasto energético celular (SUAREZ, 2008). Quando comparado os valores pós-descongelamento aos outros tempos de TTRL, o TTRL de 3 e 5 horas tiveram valores médios superiores de VCL e ALH, indicando nessa temperatura e nesses tempos uma hiperativação dos espermatozoides.

Tabela 1. Média \pm EPM da análise computadorizada do movimento espermático (CASA), no pós descongelamento (controle), no teste de termorresistencia rápido com o tempo de incubação de 30 minutos (TTRR30), 45 minutos (TTRR45) e 60 minutos (TTRR60) e no teste de termorresistencia lento com tempo de incubação de 3 horas (TTRL3h), 5 horas (TTRL5h) e 8 horas (TTRL8h).

Variáveis	Testes de Termorresistência						
	CONTROLE	TTRR30`	TTRR45`	TTRR60`	TTRL3h	TTRL5h	TTRL8h
VAP (um/s)	86,8 \pm 5,17 ^a	47,8 \pm 5,17 ^c	36,9 \pm 5,17 ^{cd}	26,0 \pm 5,17 ^d	103,8 \pm 5,17 ^a	100,8 \pm 5,17 ^a	86,6 \pm 5,17 ^b
VSL (um/s)	67,2 \pm 3,97 ^{ab}	40,3 \pm 3,97 ^c	29,3 \pm 3,97 ^d	20,3 \pm 3,97 ^d	74,2 \pm 3,97 ^a	72,6 \pm 3,97 ^{ab}	63,8 \pm 3,97 ^b
VCL (um/s)	145,5 \pm 8,83 ^b	74,0 \pm 8,83 ^c	59,1 \pm 8,83 ^{cd}	42,2 \pm 8,83 ^d	177,8 \pm 8,83 ^a	175,9 \pm 8,83 ^a	149,3 \pm 8,83 ^b
ALH (um)	6,7 \pm 0,42 ^c	3,4 \pm 0,42 ^d	2,7 \pm 0,42 ^d	2,4 \pm 0,42 ^d	7,9 \pm 0,42 ^{ab}	8,1 \pm 0,42 ^a	6,8 \pm 0,42 ^{bc}
BCF (Hz)	20,2 \pm 1,42 ^a	17,7 \pm 1,42 ^{ab}	14,7 \pm 1,42 ^{bc}	10,8 \pm 1,42 ^c	17,2 \pm 1,42 ^{ab}	17 \pm 1,42 ^{ab}	15,7 \pm 1,42 ^b
STR (%)	78,2 \pm 5,00 ^a	67,2 \pm 5,0 ^{ab}	55,6 \pm 5,00 ^b	35,2 \pm 5,00 ^c	72,1 \pm 5,00 ^a	72,2 \pm 5,00 ^a	70,7 \pm 5,00 ^a
LIN (%)	49,5 \pm 3,40 ^a	45,2 \pm 3,40 ^a	35,9 \pm 3,40 ^b	23,0 \pm 3,40 ^c	44,3 \pm 3,40 ^{ab}	43,6 \pm 3,40 ^{ab}	43,8 \pm 3,40 ^{ab}

VAP: velocidade de trajeto, VSL: velocidade progressiva, VCL: velocidade curvilínea, ALH: amplitude lateral da cabeça, BCF: frequência de batimentos flagelares, STR: retilinearidade, LIN: linearidade, EPM: Erro padrão da média. Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças estatísticas (P<0,05).

4. CONCLUSÃO

O Teste de termorresistencia lento com período de incubação de 3 horas é o teste que apresenta menor prejuízo ao espermatozoide. Teste de termorresistencia rápido causa mais lesões aos espermatozói de diminuindo sua viabilidade. Este estudo demonstra que ainda são necessários mais estudos quanto a eficiência dos testes de termorresistência para mensurar a viabilidade espermática, e principalmente relacionar seus resultados com os índices de fertilidade em programas de inseminação artificial.

5. AGRADECIMENTOS

O aluno agradece ao CNPQ pela bolsa PIBIC concedida nos 3 primeiros meses do projeto e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa (FAPESP,



processo 2021/11746-0) pela concessão dos projetos, bolsas e financiamento; ao laboratório de reprodução de bovinos de corte do Instituto de Zootecnia, a GENEX Brasil e a Central Bela Vista.

6. REFERÊNCIAS

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C. et. al. Importância da qualidade do semen em programas de IATF e TEFT. In: **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina. Anais Palestra: p. 166-179, 2004.

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

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

CUNHA, E. R.; SILVA, C. G.; MARTINS, C. F. Estudo comparativo dos testes de termoresistência rápido, lento e fisiológico em sêmen criopreservado bovino importado. In: **Anais da 49ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**; 23-26 de julho de 2012.

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

DIMITROPOULOS, E. La significaction du test de la thermoresistence dans l'appreciation de la valeur fécondante du sperme congele. **Ann Med Vet**. 4: 215 – 24, 1967.

EMERICK, L.L.; DIAS, J.C.; VALE FILHO, V.R. et al. Avaliação da integridade de membrana em espermatozoide bovino criopreservado para prever o índice de prenhez. **Ciênc. Anim. Bras.**, v.12, p.536-546, 2011.

MARQUEZ, B.; SUAREZ, S.S. Bovine Sperm Hyperactivation Is Promoted by Alkaline Stimulated Ca²⁺ Influx1. **Biology of Reproduction**, v.76, n.4, p.660–665, 2006.

MUIÑO R.; RIVERA, M.M.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; PEÑA, A.I. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. **Animal Reproduction Science** 109:50-64, 2008.

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

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

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

SUAREZ, S.S. Control of hyperactivation in sperm. **Human Reproduction Update**, v.14, n.6, p.647–657, 2008.

TALLINI, R.; KOZICKI, L.E.; GAIEVSKI, F.R.; POLO, G.; LIMA, L.G.F.; SANTIAGO, J.; SEGUI M.S.; WEISS, R.R.; GALAN, T.G.B. Bovine semen thermoresistance tests and their correlation with pregnancy rates after fixed-time artificial insemination. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.71, n.6, p.2085-2092, 2019.

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



VIANNA, F.P.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; MELO, C.M.; DELL'AQUA, J.A. JR. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. **Anim. Reprod. Sci.** Jul;113(1-4):279-82, 2009.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their postthawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p871-891, 1995.