

## CORRELAÇÕES ENTRE MOTILIDADE PROGRESSIVA E RETENÇÃO DO ACROSSOMO EM SÊMEN CONGELADO DE BOVINOS APÓS O DESCONGELAMENTO E APÓS PROVAS DE TERMO RESISTÊNCIA

RENATO CAMPANARUT BARNABE  
Professor Adjunto  
Faculdade de Medicina Veterinária  
e Zootecnia da USP

VALQUIRIA HYPPÓLITO BARNABE  
Professor Livre Docente  
Faculdade de Medicina Veterinária  
e Zootecnia da USP

WILSON GONÇALVES VIANA  
Professor Assistente  
Faculdade de Medicina Veterinária  
e Zootecnia da USP

JOSÉ ANTONIO VISINTIN  
Auxiliar de Ensino  
Faculdade de Medicina Veterinária  
e Zootecnia da USP

JOÃO FLORIANO CASAGRANDE  
Médico Veterinário  
SEMBRA - Técnicas e Produtos  
de Reprodução Ltda. - Barretos

CARLOS ALBERTO DE ALMEIDA  
Médico Veterinário  
SEMBRA - Técnicas e Produtos  
de Reprodução Ltda. - Barretos

BARNABE, R.C.; BARNABE, V.H.; VIANA, W.G.; VISINTIN, J. A.; CASAGRANDE, J.F.; ALMEIDA, C.A. Correlações entre motilidade progressiva e retenção do acrossomo em sêmen congelado de bovinos após o descongelamento e após provas de termo resistência. *Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ.S. Paulo*, 18(1): 61-68, 1981.

**RESUMO:** Duzentas ampolas de sêmen de bovinos foram analisadas visando o estudo de correlações entre a motilidade progressiva dos espermatozoides após o descongelamento e após as provas rápida (1 hora a 45° C) e lenta (5 horas a 38° C) de termo resistência e a prova de retenção do acrossomo. Os exames da motilidade progressiva foram realizados em microscópio óptico, com aumento de 200X e a prova de retenção do acrossomo em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000X e em microscopia de contraste de interferência diferencial, com aumento de 1250X, ambas com objetiva de imersão. As análises estatísticas revelaram as seguintes correlações significantes ( $P < 0,01$ ) entre motilidade progressiva dos espermatozoides e a prova de retenção do acrossomo: a) negativa para ambas as características após o descongelamento; b) positiva para motilidade progressiva após a prova rápida de termo resistência e retenção do acrossomo após o descongelamento; c) negativa para ambas as características após as provas rápida e lenta de termo resistência.

**UNITERMOS:** Acrossomo, retenção\*; Motilidade progressiva\*; Sêmen congelado, avaliação\*; Correlações\*.

## INTRODUÇÃO

Diversas provas de laboratório têm sido comunicadas para prever o desempenho de partidas de sêmen, visando sua utilização em inseminação artificial. Dentre elas, surgiram recomendações de exames envolvendo a capacidade de resistência espermática ao calor, durante períodos variáveis, com imediata verificação dos efeitos sobre a motilidade progressiva dos espermatozoides. Posteriormente, considerando a importante função do acrossomo no processo de fecundação do óvulo, procurou-se determinar o índice de integridade desse órgão nas amostras analisadas, verificando os efeitos do tratamento térmico e procurando estabelecer relações entre os fatores motilidade espermática e patologia do acrossomo.

A destruição do acrossomo, bem como suas lesões podem ser causadas por senescência, passando por uma distinta sequência de alterações<sup>11, 21</sup>, por choque térmico<sup>27,32</sup>, por manipulação indevida do sêmen durante seu processamento<sup>13</sup> ou ainda por prolongada abstinência do reprodutor<sup>4</sup>. A extrema fragilidade do acrossomo, sendo considerado um reservatório de enzimas comparável ao lisossomo na composição química, função fisiológica e origem, impõe que métodos adequados de exame sejam elaborados a fim de evitar artefatos técnicos que originariam interpretações errôneas por fixação de esfregaços de sêmen observados à luz da microscopia comum. Assim, o estudo da morfologia do acrossomo é melhor realizado em preparações úmidas fixadas pelo formol salino em microscopia de contraste de fase, ou em solução salina fosfatada com 0,2 g de glutaraldeído em microscopia de contraste de interferência diferencial<sup>19</sup>.

O efeito de diferentes diluidores, como o leite desnatado, o gema citrato, o citrato de sódio a 2,9%<sup>11</sup> e outros à base de glicina<sup>12</sup>, sobre a retenção do acrossomo durante incubação a 37°C, demonstrou que a motilidade não indica, necessariamente, a habilidade celular de manter suas membranas. Além disso, foi sugerida a existência de amplas variações diárias na incidência de anormalidades do acrossomo, indicando que certas condições ambientais podem afetar sua integridade<sup>20</sup>.

A correlação relativamente baixa ( $r = 0,56$ ) entre motilidade e manutenção do acrossomo<sup>19</sup> sugere que os reprodutores, as ejaculações e a tecnologia do sêmen devem ser reexaminados ao se utilizar o acrossomo como critério<sup>22</sup>. A maior correlação entre porcentagem de acrossomos inalterados e fertilidade de sêmen bovino congelado foi observada após 2 e 4 horas de incubação a 37° C ( $r = 0,60$  e  $0,58$ )<sup>24</sup>, enquanto que, relativamente à motilidade espermática, a maior correlação ( $r = 0,46$ ) foi obtida às zero horas, com base no índice de não retorno aos 90 dias<sup>23</sup>. Por outro lado, correlação negativa altamente significativa ( $r = -0,267$ ) foi encontrada entre anomalias do acrossomo e a congelabilidade do sêmen<sup>5</sup>.

Ritmos de descongelamento rápido em temperaturas mais elevadas favoreceram a porcentagem de manutenção do acrossomo e da motilidade espermática<sup>6, 8, 14, 16, 26</sup>, acrescentando-se que à medida que o nível de glicerol é aumentado acima de 4%, há necessidade de acelerar o ritmo de descongelamento<sup>17</sup>. Estabeleceu-se, ainda, que as condi-

ções ótimas condizentes com danos celulares mínimos seriam 8,5% de glicerol em conjunção com descongelamento a 65° C e tempo de exposição de 7,5 segundos<sup>18</sup>.

Submetendo sêmen congelado à incubação de 37° C, verificou-se que o ritmo de descongelamento tem maior influência sobre a manutenção do acrossomo do que o tempo de equilíbrio<sup>2, 30, 31</sup>. Em contraposição, já se afirmou que, para obtenção de melhores resultados, o sêmen deverá ser submetido a longo tempo de equilíbrio de 18 horas<sup>29</sup>. Além disso, o descongelamento a 5° C ou 35° C, seguido de manutenção do sêmen a 20° C e a 37° C durante 1 ou 3 minutos, antes da incubação (4 e 8 horas<sup>25</sup> ou 3 e 6 horas<sup>1</sup>), provou que o material descongelado a 35° C apresenta qualidades superiores no que se refere à motilidade espermática e à porcentagem de acrossomos intatos. No entanto, altas temperaturas de descongelamento não podem ser recomendadas para uso rotineiro no campo, devido ao perigo de super-aquecimento dos espermatozoides, se o tempo não for rigidamente controlado<sup>9</sup>. Por sua vez, o próprio processo de congelamento pode resultar em significativo aumento da espessura do acrossomo<sup>28</sup>.

Alegando economia de tempo, sugeriu-se restringir a avaliação da integridade do acrossomo a amostras de sêmen com índice inferior a 35% de motilidade após incubação a 37° C por 4 horas<sup>10</sup>. Considerando a subjetividade das estimativas de motilidade, o método fotográfico tem sido aconselhado<sup>7</sup>, por possibilitar a repetição das contagens com a mesma fidelidade com que se procede à avaliação porcentual do acrossomo, sendo que esta técnica não virá substituir outros métodos de avaliação, porém, suplementá-los com grande eficiência.

No presente trabalho, procurou-se estudar em material normalmente comercializado por Central de Inseminação Artificial, meios de avaliação espermática, examinando particularmente possíveis correlações entre a motilidade progressiva após o descongelamento e após as provas rápida e lenta de termo resistência em relação à prova de retenção do acrossomo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo das correlações propostas no presente trabalho, foram utilizadas 200 ampolas de sêmen proveniente de 10 touros, sendo 4 da raça Holandesa, variedade branca e preta, 2 da raça Holandesa, variedade branca e vermelha, 2 Chianina e 2 Nelore, doadores em Central de Inseminação Artificial, localizada em Barretos, Estado de São Paulo. As ampolas de sêmen eram originárias de partidas em estoque na Central, previamente selecionadas quanto à qualidade espermática e correspondiam a 4 grupos de 50, referentes a congelamentos efetuados, respectivamente, nos anos de 1975, 1976, 1977 e 1978.

A tecnologia empregada para o congelamento consistiu na adição de 11 g de lactose p.a. a 100 ml de água destilada, juntando-se, após dissolução em banho-maria, 7% de glicerol p.a. e 20% de gema de ovo. O sêmen em sua diluição final foi submetido a um tempo de equilíbrio variável de 4 a 6 horas, seguido de congelamento em vapores de nitrogênio à uma distância de 3 cm da superfície do nitrogênio líquido, durante 15 minutos. Decorrido este tempo, as ampolas

foram imersas no nitrogênio líquido e, posteriormente, estocadas.

Para o descongelamento do sêmen, as ampolas foram colocadas em cubas de "isopor" contendo água e gelo, durante 3 a 5 minutos.

Os exames relativos à motilidade progressiva dos espermatozoides e à prova de retenção do acrossomo foram realizados com amostras logo após o descongelamento, após manutenção em banho-maria a 45° C por 1 hora (prova rápida de termo resistência)<sup>3</sup> e ainda após 5 horas a 38° C (prova lenta de termo resistência).

As avaliações da motilidade progressiva, estimada subjetivamente em porcentagem, foram feitas entre lâmina e lamínula sobre placa de platina aquecida a 37° C e examinadas em microscópio óptico com aumento de 200X.

O exame microscópico em contraste de fase (\*) foi realizado com aumento de 1000X e objetiva de imersão, entre lâmina e lamínula lutadas com esmalte para unhas, retirando-se uma gota do material seminal diluído em solução tampão de formol salino, preparada da seguinte maneira:

### 1. Solução tampão estoque

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O . . . . .	21,682 g	200 ml
H <sub>2</sub> O destilada para . . . . .	500 ml	
		+
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	22,254 g	80 ml
H <sub>2</sub> O destilada para . . . . .	500 ml	

### 2. Solução estoque de cloreto de sódio

NaCl . . . . .	9,01 g
H <sub>2</sub> O destilada para . . . . .	500,0 ml

### 3. Solução tampão de formol salino

a) Solução tampão estoque . . . . .	100ml
b) Solução estoque de cloreto de sódio	150ml
c) Formalina comercial . . . . .	62,5ml
d) H <sub>2</sub> O destilada para . . . . .	500,0ml

(\*) Reichert 00.62.42 Zetopan, Áustria.

O exame em microscopia de contraste de interferência diferencial\* foi executado com aumento de 1250X, segundo a técnica já descrita, porém com o material seminal diluído em solução de glutaraldeído a 0,2%, cujo preparo é o seguinte:

### 1. Solução tampão de fosfato salino

NaCl . . . . .	8,1714g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O . . . . .	0,3943g
Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O . . . . .	1,9810g
Thimerosal (Merthiolate) . . . . .	0,0952g
H <sub>2</sub> O destilada para . . . . .	1.000ml

### 2. Solução estoque de glutaraldeído

Glutaraldeído . . . . .	8,0g
H <sub>2</sub> O destilada para . . . . .	100,0ml

### 3. Solução de glutaraldeído a 0,2%

- a) Solução tampão de fosfato salino . . . 39,0ml  
 b) Solução estoque de glutaraldeído . . . 1,0ml

Em cada preparação foi observado um total de 200 espermatozoides, incluindo normais e anormais, expressando-se os resultados em porcentagem.

Para os cálculos estatísticos<sup>16</sup> foram utilizadas médias aritméticas, erro padrão da média, desvio padrão e coeficiente de correlação de Pearson com teste "t" de Student, fixando em 0,01 o nível de rejeição.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os processos patológicos do acrossomo e suas causas têm merecido a atenção dos pesquisadores com crescente interesse<sup>4,13,21,27,32</sup>. Assim, grande número de trabalhos tem sido efetuado, focalizando a integridade do acrossomo para avaliação de sêmen congelado submetido à incubação, bem como tentativas de correlações com a motilidade progressiva e outros parâmetros ligados à fertilidade, tecnologia do sêmen, qualidade dos reprodutores e meio ambiente<sup>10,11,20,22</sup>.

Tratando-se de sêmen congelado, vários fatores ligados à tecnologia têm sido estudados e apontados como responsáveis por melhor manutenção do acrossomo e da motilidade progressiva. Entre eles, o ritmo rápido de descongelamento em altas temperaturas<sup>1,2,16,25,26,31</sup>, o tempo de equilíbrio<sup>30</sup>, o nível de glicerol<sup>17,18</sup>, o índice de congelabilidade<sup>5</sup>. No entanto, o descongelamento em altas temperaturas para uso de rotina não é aconselhável<sup>9,29</sup> devido ao perigo de superaquecimento dos espermatozoides, assim como já foi indicado o efeito deletério da glicina sobre o acrossomo, ao mesmo tempo que aumenta a motilidade progressiva<sup>12</sup>.

As ampolas de sêmen utilizadas no presente trabalho foram descongeladas em água com gelo, de acordo com o recomendado<sup>8,14</sup> para esse método de envazamento. Após serem submetidas às provas de termo resistência, as amostras de sêmen revelaram significativo aumento nas porcentagens de acrossomos anormais (Tabela 1), partindo de 2,78%, em média para os 4 anos, após o descongelamento, para 5,16% depois do teste rápido e 6,78% após o lento, quando examinadas em microscopia de contraste de fase. Em microscopia de contraste de interferência diferencial, esses dados foram, respectivamente, 4,70%, 7,81% e 10,55%, resultados que concordam com os apresentados na literatura<sup>6</sup>, embora outros<sup>28</sup> tenham atribuído pouco efeito da incubação a 37° C no encontrado aumento da espessura do acrossomo.

Para analisar a relação entre o fator motilidade progressiva e anormalidades do acrossomo, os dados foram submetidos ao coeficiente de correlação de Pearson e teste "t" de Student, cujos resultados encontram-se na Tabela 2.

A motilidade progressiva após o descongelamento das amostras apenas mostrou correlação negativa significante ( $P < 0,01$ ) todavia de baixa intensidade ( $r = -0,18$ ), com a porcentagem de acrossomos anormais, também após o descongelamento, quando os exames foram feitos em microscopia de contraste de interferência diferencial. Isto significa que quanto melhor a motilidade progressiva inicial, menor é a porcentagem de acrossomos anormais presente na amostra.

Na coluna central da Tabela 2, verifica-se que apenas não atingiu um nível de significância a correlação entre motilidade progressiva após o teste rápido de termo resistência e patologia do acrossomo examinada em microscopia de contraste de fase, depois do teste lento. Por outro lado, dos dois primeiros parâmetros estudados ( $r = 0,27$  e  $r = 0,30$ ) deduz-se que os baixos valores para patologia do acrossomo, encontrados após o descongelamento (médias 2,78% e 4,70% - Tabela 1), passaram a apresentar correlação positiva com a motilidade progressiva, uma vez que esta também diminuiu (média 19,77% - Tabela 1), devido aos efeitos da prova rápida de termo resistência. As três correlações seguintes ( $r = -0,36$ ,  $r = -0,33$  e  $r = -0,29$ ), no entanto, revelaram-se negativas, já que à motilidade progressiva diminuída corresponderam significantes aumentos das porcentagens de acrossomos anormais (médias 5,16%, 7,81% e 10,55% - Tabela 1).

A motilidade progressiva após o teste lento de termo resistência, embora sensivelmente diminuída (média 6,12% - Tabela 1), não foi suficiente para mostrar correlação com a baixa porcentagem de patologia do acrossomo após o descongelamento em nenhum dos dois métodos microscópicos. Não obstante, correlações negativas ( $r = -0,24$ ,  $r = -0,24$ ,  $r = -0,35$  e  $r = -0,21$  - Tabela 2) e altamente significantes ( $P < 0,01$ ) foram obtidas com os outros quatro parâmetros estudados, inferindo-se que às motilidades progressivas menores corresponderam maiores porcentagens de acrossomos anormais (médias 5,16%, 6,78%, 7,81% e 10,55%), tanto após as provas rápida e lenta de termo resistência, como em microscopia de contraste de fase e de interferência diferencial. Esta verificação praticamente coincide

(\* ) Leitz Dialux 20 - Welzlar, Alemanha Ocidental.

de com o que já foi comentado em relação aos resultados após a prova rápida de termo resistência e é coerente com o encontrado após o descongelamento, onde maiores valores para motilidade progressiva inicial correlacionaram-se com menores porcentagens de acrossomos anormais.

No confronto desses coeficientes de correlação com os citados na literatura consultada, verifica-se que apresentam valores inferiores. Assim é que já foi comunicada correlação de 0,56 entre motilidade espermática e retenção do acrossomo<sup>19</sup> e de 0,42 e 0,60, relacionando a fertilidade baseada no índice de não retorno aos 90 dias e a motilidade e porcentagem de acrossomos anormais, respectivamente, após 10 horas de incubação das amostras a 37° C<sup>24</sup>. Referiu-se, ainda, coeficiente de correlação de 0,46 entre fertilidade e motilidade espermática avaliada antes da incubação<sup>23</sup>, enquanto outros<sup>8</sup> concluíram que a retenção do acrossomo apresenta correlação mais alta com a fertilidade do que com a motilidade.

Diante do exposto e dos resultados obtidos, verifica-se que avaliando somente a motilidade progressiva, não existem indicações suficientes do desempenho do sêmen, já que muitas amostras com altas porcentagens de espermatozoides anormais podem apresentar boa motilidade. Neste sentido, o ideal seria estabelecer uma fórmula única ou índice de seleção abrangendo múltiplas características<sup>7</sup>, principalmente motilidade progressiva, integridade do acrossomo e contagem de anormalidades espermáticas.

Por enquanto, porém, em condições de laboratório, apesar dos crescentes progressos, a avaliação precisa da qualidade do sêmen congelado deverá continuar envolvendo várias provas, a melhor das quais resta ainda por ser definida.

## CONCLUSÕES

A determinação de correlações entre motilidade progressiva dos espermatozoides e prova de retenção do acrossomo, para avaliação da qualidade de sêmen congelado de bovinos, rotineiramente utilizado em nosso meio criatório, permitiu concluir:

1. quanto melhor a motilidade progressiva inicial da amostra, menor é a incidência de acrossomos anormais, logo após o descongelamento do sêmen.
2. baixos valores para patologia do acrossomo encontrados após o descongelamento correlacionam-se positiva e significativamente com a motilidade progressiva diminuída após a prova rápida de termo resistência.
3. após as provas rápida e lenta de termo resistência, os aumentos das porcentagens de acrossomos anormais correlacionam-se negativa e significativamente com a diminuição da motilidade progressiva, isto é, quanto menores os valores para motilidade progressiva, maiores são as porcentagens de acrossomos anormais.

BARNABE, R.C.; BARNABE, V.H.; VIANA, W.G.; VISINTIN, J.A.; CASAGRANDE, J.F.; ALMEIDA, C.A. Correlations bet-

ween progressive motility and acrosomal retention after thawing and after incubation at 38° C or 45° C of frozen bull semen. *Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ.S. Paulo*, 18(1): 61-8, 1981.

**SUMMARY:** Correlation determinations for the relationship between progressive motility of sperm cells and acrosomal retention were calculated on 200 ampules of frozen bull semen after thawing and after incubation at 45° C for 1 hour or at 38° C for 5 hours (Quick and Slow Thermoresistance Tests). Evaluations of progressive motility were estimated at 200 magnifications in optics microscope and those of acrosomal retention under 1000X magnifications phase-contrast or 1250X magnifications differential interference contrast microscopies, both in oil immersion. Highly significant correlations ( $P < .01$ ) were so observed for progressive motility and acrosomal retention: a) negative correlation between both characteristics after thawing; b) positive correlation between progressive motility after Quick Thermoresistance Test and acrosomal retention after thawing; c) negative correlation between both characteristics after Quick and Slow Thermoresistance Tests.

**UNITERMS:** Acrosomal retention\*; Progressive motility\*; Frozen semen evaluation\*; Correlations\*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ALMQUIST, J.O. Effect of cold shock after thawing on acrosomal maintenance and motility of bovine spermatozoa frozen in plastic straws. *J. Dairy Sci.*, 59: 1825-9, 1976.
- 2- ALMQUIST, J.O. Sperm survival not affected when straws thawed at very high temperatures. *A.I. Dig.*, 24(10): 6, 1976.
- 3- BARNABE, V.H. **Avaliação de sêmen congelado de bovinos, com especial referência à integridade do acrossomo.** São Paulo, 1979. [Tese de Livre Docência - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP]
- 4- BLOM, E. Interpretation of spermatid cytology in bulls. *Fertil. and Steril.*, 1: 223-38, 1950.
- 5- CASAGRANDE, J.F. **Relações entre algumas características físicas e morfológicas do sêmen de zebrúinos e sua congelabilidade.** Jaboticabal, 1973. [Tese de doutoramento - Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia]
- 6- COULTER, G.H. & FOOTE, R.H. The motility, acrosomal morphology and oxygen uptake of bull spermatozoa during processing and after freezing in straws. *A.I.Dig.*, 22(12): 12-5, 1974.
- 7- ELLIOT, F.I. Techniques for evaluation of bovine semen. In: **TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION**, 6., Milwaukee, 1976. **Proceedings**. p.94-5.

- 8- FLEMING, W.N.; OLAR, T.R.; MITCHELL, J.R. Techniques for evaluation of frozen bovine semen at Curtiss Breeding Service. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 6., Milwaukee, 1976. **Proceedings**. p.88-90.
- 9- GILBERT, G.R. & ALMQUIST, J.O. Effects of processing procedures on post-thaw acrosomal retention and motility of bovine spermatozoa packaged in .3-ml straws at room temperature. **J.Anim.Sci.**, 46: 225-31, 1978.
- 10- MARSHALL, C. & FREY, L. Semen evaluation at selected sires. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 6., Chicago, 1976. **Proceedings**. p.91-3.
- 11- MARSHALL, C. & SAACKE, R.G. Acrosomal cap of living bovine spermatozoa. **J.Anim.Sci.**, 26: 947, 1967. (res. 261).
- 12- MARSHALL, C.; SAACKE, R.G.; WHITE, J.M. Effect of glycine diluters on the acrosomal cap of bovine spermatozoa. **J.Anim.Sci.**, 51: 950, 1968. (res. P 13).
- 13- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4.ed. Livraria Sulina Ed., Porto Alegre, 1978. v.2.
- 14- OLAR, T.R.; BECKER, W.C.; SENGER, P.L. Effect of thawing rate and cold post-thaw temperatures on bovine semen packaged in glass ampules. **J.Anim.Sci.**, 44: 95-101, 1977.
- 15- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 6.ed. Piracicaba, 1976.
- 16- ROBBINS, R.K.; GERBER, L.E.; SAACKE, R.G. Influence of thaw rate on maintenance of the acrosomal cap. **J.Anim.Sci.**, 35: 253, 1972. (res. 340).
- 17- ROBBINS, R.K.; O'CONNOR, M.L.; CHANDLER, P.T.; SAACKE, R.G. Freezing of bovine semen in french straws. **J.Anim.Sci.**, 37: 327, 1973. (res. 389).
- 18- ROBBINS, R.K.; SAACKE, R.G.; CHANDLER, P.T. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosome: retention and survival of bovine spermatozoa frozen in french straws. **J.Anim.Sci.**, 42: 145-54, 1976.
- 19- SAACKE, R.G. Morphology of the sperm and its relationship to fertility. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 3., Chicago, 1970. **Proceedings**. p.17-29.
- 20- SAACKE, R.G.; AMANN, R.P.; MARSHALL, C.E. Acrosomal cap abnormalities of sperm from subfertile bulls. **J.Anim.Sci.**, 27: 1391-400, 1968.
- 21- SAACKE, R.G. & MARSHALL, C.E. Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. **J.Reprod.Fertil.**, 16: 511-4, 1968.
- 22- SAACKE, R.G. & WHITE, J.M. Acrosomal alteration of freeze-thawed bovine sperm. **J.Anim.Sci.**, 31: 229, 1970. (res. 291).
- 23- SAACKE, R.G. & WHITE, J.M. Acrosomal cap maintenance and fertility of frozen bovine semen. **J.Anim.Sci.**, 35: 253, 1972. (res. 341).
- 24- SAACKE, R.G. & WHITE, J.M. Semen quality tests and their relationship to fertility. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 4., Chicago, 1972. **Proceedings**. p.22-7.
- 25- SENGER, P.L.; BECKER, W.C.; GERBER, L.E.; HILLERS, J.K. Effect of post-thaw temperatures on frozen semen. **J.Anim.Sci.**, 41: 379, 1975.
- 26- SENGER, P.L.; BECKER, W.C.; HILLERS, J.K. Effect of thawing rate and post-thaw temperature on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws. **J.Anim.Sci.**, 42: 932-6, 1976.
- 27- SOMADE, B.; MACPHERSON, J.W.; KING, G.J. Physical damage to the head of bovine spermatozoa induced by processing and freezing. **J. Dairy Sci.**, 57: 625, 1974.
- 28- WELLS, M.E.; BRIGHT, T.L.; HEFLEY, P.J. The effect on freezing and thawing on sperm cell dimensions. **Res.Rep.agric.Exp.Stn.Okla.Sta. Univ.**, (MP-92): 272-7, 1974.
- 29- WELLS, M.E. & HEFLEY, P.J. The effect of length of equilibration time on sperm cells stored in straws. **Res.Rep.agric.Exp.Stn.Okla.Sta. Univ.**, (MP-92): 267-72, 1974.
- 30- WIGGIN, H.B. & ALMQUIST, J.O. Effect of glycerol equilibration time and thaw rate on acrosomal maintenance of bull sperm frozen in plastic straws. **J. Dairy Sci.**, 57: 625, 1974.
- 31- WIGGIN, H.B. & ALMQUIST, J.O. Effect of glycerol equilibration time and thawing rate upon acrosomal maintenance and motility of bull

66 BARNABE, R.C.; BARNABE, V.H.; VIANA, W.G.; VISINTIN, J.A.; CASAGRANDE, J.F.; ALMEIDA, C.A.

spermatozoa frozen in plastic straws. *J.Anim. Sci.*, **40**: 302-5, 1975.

1976 apud *Anim.Breed.Abstr.*, **45**: 5324, 1977.

32- ZIBRIN, M. Ultrastructural changes of acrosomes and mitochondria of bull spermatozoa incubated in vitro. *Vet.Med.*, Praha, **21**: 415-26,

Recebido para publicação em: 29-09-80.  
Aprovado para publicação em: 14-04-81.

TABELA 1 — Avaliação em porcentagem (%) da patologia do acrosso, segundo o método e tratamento utilizados e da motilidade progressiva de sêmen congelado de bovinos. São Paulo, 1979.

AVA- LIAÇÃO	MÉTO- DO	MEDIDAS ESTATÍSTI- CAS DETER- MINADAS	T R A T A M E N T O														
			DESCONGELAMENTO						T T R . R A P I D O						T T R . L E N T O		
			1975	1976	1977	1978	1975	1976	1977	1978	1975	1976	1977	1978	1975	1976	1977
PATOLO- GIA DO ACROS- SOMO	C	$\bar{X}$ S (m) s	3,54 0,12 0,86	3,19 0,14 1,04	2,92 0,15 1,07	1,48 0,19 1,35	5,65 0,24 1,74	4,63 0,13 0,96	4,76 0,17 1,20	5,63 0,26 1,86	7,14 0,24 1,70	6,30 0,18 1,32	7,14 0,24 1,70	6,30 0,18 1,32	6,11 0,23 1,67	7,59 0,37 2,61	
	I	$\bar{X}$ S (m) s	6,12 0,17 1,21	5,17 0,20 1,40	4,62 0,17 1,25	2,92 0,20 1,44	7,82 0,29 2,04	7,20 0,20 1,43	7,00 0,24 1,68	9,24 0,46 3,30	10,29 0,24 1,70	9,76 0,22 1,59	10,29 0,24 1,70	9,76 0,22 1,59	9,34 0,43 3,04	12,83 0,65 4,63	
MOTILI- DADE		$\bar{X}$ S (m) s	46,40 1,55 11,02	50,80 1,71 12,09	42,40 1,67 11,87	45,00 1,57 11,11	25,70 1,34 9,47	26,00 1,51 10,69	16,80 1,57 11,10	10,60 1,30 9,18	4,50 0,84 5,99	10,50 1,08 7,64	4,50 0,84 5,99	5,40 0,91 6,44	4,10 0,75 5,31		

C = microscopia de contraste de fase

I = microscopia de contraste de interferência diferencial

$\bar{X}$  = média aritmética

T.T.R. = teste de termostabilidade

S (m) = erro padrão da média

s = desvio padrão

**TABELA 2** – Coeficiente de correlação de Pearson e teste “t” de Student, calculados em função da motilidade progressiva após o descongelamento e após as provas rápidas e lenta de termorresistência com relação à patologia do acrossomo em sêmen congelado de bovino. São Paulo, 1979.

CONTRA PATOLOGIA DO ACROSSOMO APÓS	MOTILIDADE APÓS	DESCONGELAMENTO			T.T.R. RÁPIDO			T.T.R. LENTO		
		r	t	Sig.	r	t	Sig.	r	t	Sig.
Descongelamento em I		-0,18	2,66	**	0,27	4,04	**	-0,04	0,57	n.s.
Descongelamento em C		-0,08	1,14	n.s.	0,30	4,47	**	0,00	0,01	n.s.
T.T.R. Rápido em I		0,03	0,46	n.s.	-0,36	5,53	**	-0,24	3,54	**
T.T.R. Rápido em C		-0,03	0,47	n.s.	-0,33	4,98	**	-0,24	3,49	**
T.T.R. Lento em I		-0,05	0,77	n.s.	-0,29	3,29	**	-0,35	5,39	**
T.T.R. Lento em C		-0,09	1,37	n.s.	-0,10	1,47	n.s.	-0,21	3,03	**

\*\* = (P < 0,01)

r = coeficiente de correlação de Pearson

t = teste “t” de Student

Sig. = significância

n.s. = não significante

T.T.R. = teste de termorresistencia

C = microscopia de contraste de fase

I = microscopia de contraste de interferência diferencial