

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN FRESCO DE TOUROS JOVENS DA RAÇA COMPOSTO TROPICAL MONTANA E SUAS CORRELAÇÕES COM O TESTE HIPOSMÓTICO

[Evaluation of fresh semen quality of young Montana Tropical Compound bulls and its correlations with the hypoosmotic test]

Leonardo Franco Martins^{1*}, Rogério Oliveira Pinho², Jeanne Broch Siqueira³, Fúlvio Domeneck⁴, Tamires Miranda Neto⁴, José Domingos Guimarães⁵

1 Faculdade Anhanguera Educacional, Departamento de Medicina Veterinária, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

2 Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

3 Universidade Federal de Alegre, Departamento de Veterinária, Alegre, Espírito Santo, Brasil

4 Agro-Pecuária CFM Ltda., São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

5 Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinária (Coordenador)

RESUMO - Este estudo teve como objetivo estudar as correlações entre a qualidade seminal com o teste hiposmótico de sêmen *in natura* de bovinos jovens da raça Composto Tropical Montana. Oito animais foram classificados em aptos e 23 inaptos à reprodução, com idades variando de 18 a 22 meses, com base nas diferenças observadas em relação ao perímetro escrotal e aos defeitos maiores e totais. Não houve diferença entre os grupos em relação aos aspectos físicos do ejaculado e o teste hiposmótico. Os resultados do teste hiposmótico se correlacionaram positivamente com os aspectos físicos do sêmen e negativamente com os aspectos morfológicos do sêmen. Com estes resultados conclui-se que o teste hiposmótico não foi eficiente em prever a aptidão reprodutiva de touros jovens da raça Composto Tropical Montana.

Palavras-chave: andrologia; bovino; teste hiposmótico.

ABSTRACT - This study aimed to study the relationships between semen quality and hypoosmotic test in fresh semen of young Montana Tropical Compound bulls. Eight animals were classified as sound and 23 as unsound for breeding with 18 to 22 months old, based on the differences observed regarding scrotal circumference, major and total spermatozoa defects. There was no difference between groups in physical semen aspects and hypoosmotic test. The results of hypoosmotic test correlated positively with physical semen aspects and negatively correlated with sperm morphology. According these results it was concluded the hypoosmotic test did not efficient to predict the reproductive potential of Montana Tropical Compound bulls.

Keywords: andrology, bovine, hypoosmotic test.

* Autor para correspondência: rogerio_op@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Em 1994 teve início o programa Composto Montana Tropical, comandado pela Agro-Pecuária CFM Ltda. e pela Leachman Cattle Company, juntamente com mais 20 franqueados espalhados por todo o território brasileiro (Leachman, 2000). O Montana Composto Tropical possui uma genética que permite apresentar índices produtivos mais próximos de raças européias do que as zebuínas, e pode ser uma alternativa de cruzamento em condições tropicais (Bueno et al., 2008). O Montana é uma raça composta de 4 tipos biológicos (NABC), segundo suas semelhanças de tipo, função, fisiologia, aspectos de crescimento e reprodução, sendo o grupo N composto de animais *Bos taurus indicus* (Nelore, Guzerá, Gir), o grupo A, bovinos de origem não zebuína adaptados aos trópicos (Bonsmara, Caracu, Senepol), o grupo B, composto de animais *Bos taurus taurus* de origem britânica (Aberdeen Angus, Hereford, Red Angus) e o grupo C, incluindo animais *Bos taurus taurus* de origem na Europa continental (Charolesa, Limousin, Simental) (Ferraz et al., 1999; Dias, 2000).

Larsson e Rodriguez-Martinez (2000) defendem a idéia que diversos testes complementares podem ser utilizados para uma primeira triagem em animais jovens a fim de detectar futuros machos doadores de sêmen. A associação entre motilidade e morfologia espermática, no sêmen de touros com bom desenvolvimento testicular e libido normal, estão entre os principais critérios utilizados na avaliação andrológica (Parkinson et al., 2004), mas é necessário a utilização de testes complementares para a identificação de casos de subfertilidade (Kastelic e Thundathil, 2008). Dentre os testes complementares, o teste hiposmótico é rotineiramente utilizado e consiste no aumento de volume celular dos espermatozoides expostos a uma solução hiposmótica, associada a uma expansão da membrana plasmática e consequente alteração das estruturas utilizadas para a movimentação dos espermatozoides, forçando o flagelo a curvar-se em espermatozoides com a membrana intacta (Revel e Mrode 1994). Adicionalmente, o teste hiposmótico avalia a atividade bioquímica da membrana intacta, característica necessária aos processos de capacitação, reação do acrossoma e fertilização, apresentando, portanto relação com a qualidade e fertilidade do sêmen de bovinos (Revel e Mrode 1994; Fraser et al., 2005; Vera-Munoz et al., 2009). Este estudo teve como objetivo estudar as correlações entre os aspectos físicos e morfológicos do sêmen com o teste hiposmótico em sêmen *in natura* de touros jovens da raça Montana Tropical.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no município de Pontes Gestal – SP, fazenda de propriedade da Agro-pecuária CFM Ltda., situada na Região Noroeste do Estado de São Paulo, latitude de 20-21° Sul e longitude de 50-51° Oeste, com temperatura média de 24 °C e precipitação pluviométrica anual de 1.189 mm³. Os animais, com idades variando de 18 a 22 meses, foram criados em condição de pastagem, predominantemente de capim *Brachiaria decumbens* e colônia, até os 18 meses de idade, quando então passaram a ser criados em regime de confinamento e alimentados com silagem de milho e sorgo, sal mineral e água *ad libitum*.

Foi realizado exame andrológico em 31 animais, que foram classificados como aptos ou inaptos à reprodução de acordo com critérios do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), sendo que o grupo de animais inaptos à reprodução foram classificados somente quanto ao seu espermiograma, não sendo utilizados animais considerados inaptos por outro achado clínico reprodutivo, como: assimetria testicular, problemas de casco ou aprumos, baixo perímetro escrotal, vesiculite entre outros.

Após a contenção individual dos animais em troncos apropriados foram realizadas a palpação das vesículas seminais (avaliação de tamanho, simetria, lobulação e consistência para detecção de possíveis alterações) e as mensurações testiculares. A obtenção do perímetro escrotal foi realizada com auxílio de uma fita métrica, mensurando na região mais larga do escroto após leve tração ventro-caudal das gônadas. Para obtenção do comprimento e largura testicular foi utilizado um paquímetro, onde o comprimento foi mensurado no sentido longitudinal da gônada (dorso-ventral), incluindo cabeça e excluindo a cauda do epípidimo. A largura foi mensurada na maior porção da gônada no sentido latero-medial.

O sêmen foi coletado pelo método de eletroejaculação e para a avaliação física do sêmen foram analisadas as seguintes características: volume (mL), densidade (aquoso, opalescente, leitoso e cremoso), turbilhonamento (0-5), motilidade espermática progressiva retilínea (%) e o vigor espermático (0-5). Uma gota de sêmen foi colocada em uma lâmina previamente aquecida a 37°C. Em aumento microscópico de 10x, foi avaliado o turbilhonamento (movimento espermático em massa). Posteriormente, uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37°C e em aumento de 400x,

foram avaliados a motilidade espermática progressiva retilínea e o vigor espermático (CBRA, 1998).

Em um tubo contendo 1mL de formol-salino tamponado (Hancoch, 1957) foram acondicionadas alíquotas do ejaculado para posterior análise morfológica dos espermatozoides por meio de preparação úmida, com auxílio de microscopia de contraste de fase em aumento de 1250x (sob uma gota de óleo de imersão). Foram então avaliadas 400 células por ejaculado, determinando o percentual de espermatozoides normais e de anomalias de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda e classificados em defeitos espermáticos maiores, menores e totais, conforme os critérios utilizados por Blomm (1973) e os animais do presente experimento foram então classificados em aptos (70% de motilidade espermática progressiva, defeitos espermáticos maiores inferiores a 15% e defeitos espermáticos totais inferiores a 30% de anomalias) e inaptos à reprodução (padrões físicos inferiores e percentuais de anomalias espermáticas acima do valor padrão dos aptos).

O teste hiposmótico foi realizado conforme protocolo adotado por Revell e Mrode (1994). O teste consistiu em incubar 10 µL de sêmen por 1 hora à 37 °C em 1 mL de solução hiposmótica. A solução hiposmótica teve a seguinte composição: 7,35g de citrato de sódio, 13,51g de frutose em 1 litro de água destilada. Depois do período de incubação foram acrescentados 0,5 mL de formol salina para a fixação dos espermatozoides e posteriormente realizada a análise em microscopia de contraste de fase. Foram contabilizados 100 espermatozoides em aumento de 1000 X e obtido o percentual de espermatozoides que tiveram seu flagelo curvando-se junto à membrana expandida, para depois ser calculada a percentagem de espermatozoides reativos, subtraindo do percentual de defeitos de cauda registrado no sêmen *in natura* (MELO e HENRY, 1999).

Para a análise estatística foi utilizado o software SAEG versão 9.1.(SAEG-UFV, 2007). Análises descritivas quanto às médias e desvios-padrões foram feitas para todas as características. O teste Lilliefors

foi utilizado para verificação de normalidade dos dados das variáveis estudadas. A homogeneidade das variâncias foi estudada, utilizando-se o teste de Cochran-Bartlett. A análise de variância foi utilizada para se detectar as diferenças entre os animais aptos e inaptos à reprodução em relação às características físicas e morfológicas e o teste hiposmótico. As diferenças foram detectadas quando houve efeito pelo teste F (5%). O teste de Wilcoxon (5%) foi realizado para a análise do efeito dos grupos andrológicos para todos os aspectos físicos estudados. Correlações simples de Pearson (5% de significância) foram realizadas entre todas as variáveis estudadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os touros foram divididos em dois grupos; com oito classificados como aptos e 23 inaptos à reprodução após exame andrológico. O grupo de animais aptos à reprodução apresentou os maiores valores de perímetros escrotais ($p < 0,05$) (Tabela 1). De acordo com as tabelas de classificação dos animais em relação ao perímetro escrotal preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), a média de perímetro escrotal dos animais do presente estudo ($35,7 \pm 2,5$ cm) foi considerada boa para a mesma faixa etária comparando com taurinos (31 a 37 cm), e excelente quando a comparação é com os touros zebuínos (acima de 31,5 cm), além de ser superior às médias descritas por outros autores para a mesma faixa etária em touros jovens da raça Nelore (Trocóniz et al., 1991; Valentim et al., 2002; Brito et al., 2004, Silveira et al., 2010) e animais cruzados (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) dos 20 aos 24 meses de idade (Valentim et al., 2002). Fernandes Junior & Franceschini (2007) obtiveram média de perímetro escrotal semelhante ao presente estudo, com 35,4 cm em animais da mesma faixa etária. Já Pinho et al. (2012), avaliaram 52 touros da raça Montana, observando médias maiores às do presente estudo ($39,7 \pm 2,1$ e $37,2 \pm 3,0$ cm, para animais aptos e inaptos, respectivamente), porém em animais na faixa etária de 22 a 33 meses.

Tabela 1 - Percentual de espermatozoides reativos em solução hiposmótica e aspectos físicos e morfológicos do sêmen *in natura* de touros jovens da raça Composto Tropical Montana, classificados em aptos e inaptos à reprodução

| Parâmetros | Touros | | |
|------------------------------|------------------------|------------------------|-----------|
| | Aptos | Inaptos | Geral |
| Número de animais | 8 | 23 | 31 |
| Perímetro escrotal (cm) | 37,2±2,7 ^a | 35,2±2,2 ^b | 35,7±2,5 |
| Teste hiposmótico (%) | 60,1±22,1 ^a | 52,3±19,1 ^a | 54,3±19,8 |
| Aspectos físicos | | | |
| Motilidade espermática (%) | 70,0±15,1 ^a | 63,9±16,3 ^a | 65,5±16,0 |
| Vigor espermático (0-5) | 3,2±0,4 ^a | 2,9±0,6 ^a | 3,0±0,5 |
| Turbilhonamento (0-5) | 1,3±1,1 ^A | 0,5±0,8 ^B | 1,2±1,1 |
| Aspectos morfológicos | | | |
| Defeitos de Cauda (%) | 3,0±2,2 ^B | 8,4±8,3 ^A | 3,9±4,4 |
| Defeitos Maiores (%) | 16,5±5,6 ^b | 45,7±14,5 ^a | 38,2±18,2 |
| Defeitos Menores (%) | 3,7±2,2 ^a | 6,2±3,9 ^a | 5,6±3,7 |
| Defeitos Totais (%) | 20,2±6,4 ^b | 51,9±14,7 ^a | 43,7±19,1 |

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste F a 5%. ^{A,B,C} = letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Wilcoxon a 5%.

Foram detectadas diferenças entre as médias de defeitos espermáticos maiores e totais dos ejaculados de touros jovens aptos e inaptos à reprodução ($p < 0,05$), o que era esperado, devido à morfologia espermática ter sido o principal critério utilizado para a classificação andrológica. Contudo, os grupos não diferiram em relação aos aspectos físicos do ejaculado (Tabela 1), ao contrário de Pinho et al. (2012), que observaram diferenças na motilidade espermática (73,1±9,3 e 53,0±20,0%, para animais aptos e inaptos, respectivamente), o que logicamente refletiu nas diferenças também observadas por estes autores na morfologia espermática, principalmente nos defeitos totais, com 18,7±7,4% para animais aptos e 72,8±24,0 para os animais considerados como inaptos à reprodução. Fernandes Junior & Franceschini (2007) observaram resultados semelhantes ao presente estudo em relação aos defeitos espermáticos totais (19,7% para touros aptos e 51% para touros inaptos).

Brito et al. (2004) estudando maturidade sexual em touros da raça Nelore de 18 a 22 meses, utilizando também microscopia de contraste de fase, observaram média de motilidade espermática progressiva retilínea mais baixa (55%) de touros jovens maduros sexualmente, mas obtiveram médias de percentuais de defeitos espermáticos maiores (16,8%), menores (8,8%) e totais (24,4%) muito semelhantes ao presente experimento. Silveira et al. (2010) utilizando 5.903 touros da raça Nelore criados extensivamente,

com média de 21 meses de idade entre os anos de 1999 e 2003, observaram 69,5% de motilidade espermática progressiva retilínea, valor semelhante ao presente estudo. Entretanto, ao se comparar os aspectos morfológicos, Silveira et al. (2010) observaram 15,8% de defeitos espermáticos maiores e 22,1% de espermáticos totais, valores estes inferiores ao presente experimento, pois os autores verificaram 78,3% de animais maduros sexualmente.

Não houve diferença entre animais aptos e inaptos à reprodução em relação aos resultados do teste hiposmótico ($p > 0,05$) (Tabela 1), sendo que os principais tipos de dobramentos observados no presente estudo podem ser visualizados na figura 1. A média do percentual de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico foi baixa quando comparada as observadas por outros autores, como Martins et al. (2011) utilizando 6 touros adultos da raça Nelore observaram 60,3% de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico em sêmen *in natura* e 30,8% para o sêmen congelado, demonstrando os danos causados à membrana plasmática pelo processo de criopreservação. Vera-Munoz et al. (2009) utilizando touros adultos mestiços de uma central de inseminação, obtiveram média de 68,1% de espermatozoides reativos no teste hiposmótico em sêmen *in natura*, e 48,8% em sêmen congelado/descongelado.

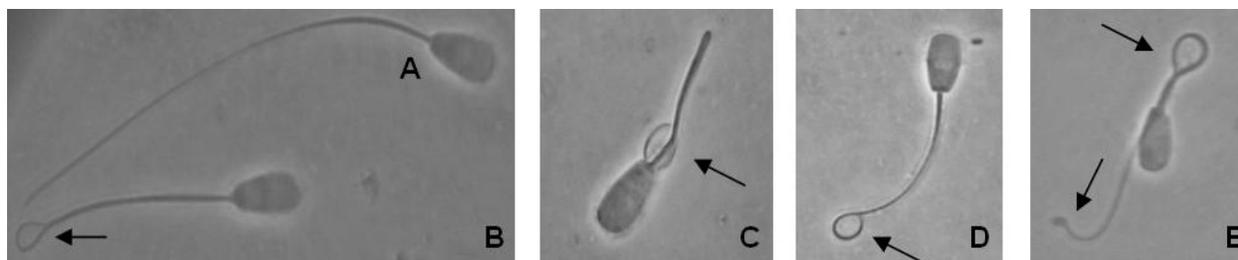


Figura 1. Principais tipos de dobramentos de cauda verificados após o teste hiposmótico. Espermatozóide não reativo (A) e reativo (setas; B, C, D e E).

Médias superiores de espermatozoides reativos podem ser explicadas pelo melhor funcionamento dos testículos e epidídimos na formação e maturação da membrana plasmática dos espermatozoides de touros adultos, bem como a ausência de repouso sexual. A cauda do epidídimo tem a função de manter os espermatozoides viáveis e fagocitar os defeituosos e os espermatozoides considerados mortos liberam enzimas que podem interferir na viabilidade dos que irão permanecer no epidídimo (Jones, 2004), causando danos à membrana plasmática dos espermatozoides (Marengo, 2008), o que pode justificar as médias baixas de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico neste experimento, visto que alguns animais poderiam estar em fase de repouso sexual.

Outro fator importante que deve ser levado em consideração para se poder explicar os resultados do teste hiposmótico é a maturação da membrana plasmática dos espermatozoides. Lunstra e Echternkamp (1982) utilizando um teste de integridade física da membrana plasmática observaram diferença entre a percentagem de espermatozoides anormais no exame morfológico do sêmen antes e depois da puberdade, mas não

verificaram entre os espermatozoides viáveis no teste supravital (eosina-nigrosina). O que pode ter ocorrido de maneira semelhante ao presente estudo, porque os touros jovens inaptos à reprodução encontravam-se na fase final da puberdade, onde se aproximavam da maturidade seminal e sexual. Isto é comprovado quando se analisa os tipos mais freqüentes de defeitos espermáticos encontrados na análise morfológica do sêmen dos touros jovens classificados como inaptos à reprodução. Os tipos mais freqüentes observados por estes autores foram gotas citoplasmáticas proximais, problemas acrossomais e caudas dobradas, defeitos espermáticos freqüentemente observados em touros jovens no final da puberdade (Parkinson, 2004).

Corroborando com Silveira et al. (2010) foram observadas correlações médias e negativas dos aspectos físicos com os morfológicos do sêmen ($p < 0,05$) (Tabela 2). Uma correlação média e positiva do perímetro escrotal com o vigor espermático e médias e negativas com os percentuais de defeitos menores e totais ($p < 0,05$) foram observadas (Tabela 2), com valores semelhantes aos observados por Silveira et al. (2010) e Dias et al. (2008).

Tabela 2 - Correlações simples de Pearson entre o teste hiposmótico e os aspectos físicos e morfológicos do sêmen *in natura* de touros jovens da raça Composto Tropical Montana

| | PE | MOT | VIG | DEFM | DEFMen | DEFT | HIPO |
|--------|----|-----|------|-------|--------|-------|-------|
| PE | 1 | NS | 0,30 | NS | -0,49 | -0,34 | NS |
| MOT | | 1 | 0,84 | -0,12 | -0,55 | NS | 0,44 |
| VIG | | | 1 | NS | -0,47 | -0,31 | 0,34 |
| DEFM | | | | 1 | NS | 0,98 | -0,37 |
| DEFMen | | | | | 1 | 0,35 | -0,35 |
| DEFT | | | | | | 1 | -0,42 |
| HIPO | | | | | | | 1 |

PE= Perímetro escrotal (cm); MOT= Motilidade espermática progressiva retilínea (%); VIG= Vigor espermático (1-5); DEFM= Defeitos maiores dos espermatozoides (%); DEFMen= Defeitos menores dos espermatozoides (%); DEFT= Defeitos totais dos espermatozoides (%); HIPO= Espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (%).

*NS = não significativo. $p > 0,05$.

Foram observadas correlações médias positivas e negativas entre os resultados do teste hiposmótico com os aspectos físicos e morfológicos ($p < 0,05$) (Tabela 2). Os percentuais de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico se correlacionaram com a motilidade espermática progressiva retilínea e o vigor espermático com valores positivos e médios ($r=0,44$ e $r=0,34$, respectivamente), corroborando com os achados de Siqueira et al. (2007) ($r=0,21$) utilizando sêmen congelado, e sendo inferiores aos de Vera-Munoz et al. (2009) com uma correlação alta e positiva em sêmen congelado ($r=0,96$). Martins et al. (2011) também observaram correlações médias e positivas dos resultados do teste hiposmótico em sêmen congelado com a motilidade espermática progressiva retilínea e o vigor espermático após o descongelamento ($r=0,38$ e $r=0,34$, respectivamente), demonstrando que quanto maior a integridade funcional da membrana plasmática, melhor os aspectos físicos do sêmen. Os aspectos morfológicos do sêmen correlacionaram com os resultados do teste hiposmótico com valores médios e negativos (Tabela 2), demonstrando que quanto maior o percentual de defeitos espermáticos no sêmen, menor a integridade bioquímica da membrana plasmática dos espermatozoides.

CONCLUSÃO

Com estes resultados podemos concluir que a integridade bioquímica da membrana plasmática dos espermatozoides medida pelo teste hiposmótico não foi eficiente em prever o potencial reprodutivo de touros jovens da raça Composto Tropical Montana. O teste hiposmótico pode ser uma importante ferramenta na avaliação do sêmen, visto as correlações favoráveis com os aspectos físicos e morfológicos do sêmen, os principais critérios de avaliação do sêmen de reprodutores.

AGRADECIMENTOS

À Agropecuária CFM Ltda. pela colaboração, doação das amostras de sêmen e disponibilização dos resultados e à CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

Blom, E. 1973. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the Bull spermogram. *Nordish Veterinary Medicin*, 25:383-39.

Brito, L.F., Silva A.E., Unanian M.M., Dode, M.A.N., Barbosa, R.T. & Kastelic, J.P. 2004. Sexual development in early and late maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. *Theriogenology*, 62:1198-217.

Bueno, R.S., Torres R.A., Ferraz J.B., Eler, J.P., Mourão, G.B., Balieiro, J.C.C. & Matos, E.C. 2008. Retenção de heterose ao longo das gerações de uma população formadora de bovinos de corte compostos. In: Anais do Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 7, São Carlos-SP, Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal.

Colégio Brasileiro De Reprodução Animal – CBRA. *Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal*. 2ª ed. Belo Horizonte. 1998. 49p.

Dias, F. 2000. Montana – composto para o Brasil. *Revista Panorama Rural*, 2(14):32-8.

Dias, J.C., Andrade, V.J., Fridrich, A.B., Salvador, D.F., Vale Filho, V.R., Corrêa, A.B. & Silva, M.A. 2006. Estimativas de parâmetros genéticos de características reprodutivas de touros Nelores, de dois e três anos de idade. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootenia*, 58(3):388-93.

Dias, J.C., Andrade, V.J., Vale Filho, V.R. & Silva, M.A. 2007. Biometria testicular e aspectos andrológicos de touros Nelore (*Bos taurus indicus*), de dois e três anos de idade, criados extensivamente. *Veterinária Notícias*, 13:31-7.

Dias, J.C., Andrade, V.J., Martins, J.A.M., Emerick, L.L. & Vale Filho, V.R. 2008. Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(1):53-9.

Fernandes Junior, J.A. & Franceschini P.H. 2007. Maturidade sexual e biometria testicular de touros jovens Compostos Montana Tropical criados a pasto. *Ars Veterinária*, 23(1):59-66.

Ferraz, J.B.S., Eler, J.P. & Golden, B.L. 1999. A formação do composto Montana Tropical. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 23:115-7.

Fraser, L.R., Adeoya-Osiguwa, S., Baxendale, R.W., Mededovic, S. & Osiuguwa, O.O. 2005. First messenger regulation of mammalian sperm function via Adenylyl Cyclase/cAMP. *Journal of Reproduction and Development*, 51:37-46.

Hancock, J.L. 1957. The morphology of boar spermatozoa. *Journal of Royal Microscopy Science*, 76:84-97.

Jones, R. 2004. Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: a hypothesis. *Biology of Reproduction*, 71:1405-11.

Kastelic, J.P. & Thundathil, J.C. 2008. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 43:368-73.

Kennedy, S.P., Spitzer, J.C., Hopkins, F.M., Higdon, H.L. & Bridges, WC Jr. 2002. Breeding soundness evaluation of 3648 yearling beef bulls using the 1993 Society for Theriogenology guidelines. *Theriogenology*, 58:947-61.

Larsson, B., Rodriguez-Martinez, H. 2000. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Animal Reproduction Science*, 61:327-36.

Leachman, L. 2000. Cruzamento ou seleção aditiva? Os dois! In: Anais do Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3, Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal.

- Lunstra, D.D. & Echtenkamp, S.E. 1982. Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. *Journal of Animal Science*, 55:638-48.
- Marengo, S.R. 2008. Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Animal Reproduction Science*, 105:52-63.
- Martins, L.F., Pinho, R.O., Paraizo, R.M., Oliveira, R.R., Castilho, E.F. & Guimarães, J.D. 2011. Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen de touros Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(7):1519-25.
- Melo, M.I.V. & Henry, M. 1999. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. *Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia*, 51(1):71-8.
- Parkinson, T.J. 2004. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. *The Veterinary Journal*, 168:215-29.
- Pinho, R.O., Costa, D.S., Siqueira, J.B., Chaya, A.Y., Miranda Neto, T., Martins, L.F., Guimarães, S.E.F. & Guimarães, J.D. 2012. Testicular echotexture and seminal quality of young Montana Tropical Compound bulls classified as sound and unsound for breeding. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(8):1961-5.
- Revell, S.G. & Mrode, R.A. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36:77-86.
- SAEG. 2007. Sistema de análise estatística e genética – SAEG versão 9.1. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Central de Processamento de Dados, 68p.
- Silveira, T.S., Siqueira, J.B., Guimarães, S.E.F., Paula, T.A.R., Miranda Neto, T. & Guimarães, J.D. 2010. Maturação sexual e parâmetros reprodutivos em touros da raça Nelore criados em sistema extensivo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(3):503-11.
- Siqueira, J.B., Guimarães, J.D., Costa, E.P., Henry, M., Torres, C.A.A., Silva, M.V.G.B. & Silveira, T.S. 2007. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36:387-95.
- Trocóniz, J.F., Beltrán, J., Bastidas, H., Larreal, H. & Bastidas, P. 1991. Testicular development, body weight changes, puberty and semen traits of growing Guzerat and Nelore bulls. *Theriogenology*, 35(4):815-26.
- Valentim, R., Arruda, R.P. Barnabé, R.C. & Alencar, M.M. 2002. Biometria testicular de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) e touros cruzados Nelore-europeu (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) aos 20 e 24 meses. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 39:113-20.
- Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Diaz, T., Vásquez, L., Schmidt, E., Desherces, S., Anton, M., Bencharif, D. & Tainturier, D. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl® and Bioxcell®. *Theriogenology*, 71:895-900.