

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA EM ESPERMATOZÓIDE BOVINO CRIOPRESERVADO PARA PREVER O ÍNDICE DE PRENHEZ

LUCAS LUZ EMERICK¹, JULIANO CESAR DIAS², VICENTE RIBEIRO DO VALE FILHO³, MARTINHO DE ALMEIDA
E SILVA³, VENÍCIO JOSÉ DE ANDRADE³, TICIANO GUIMARÃES LEITE¹, JORGE ANDRÉ MATIAS MARTINS⁴

¹Doutorando da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG - lucaslemerick@yahoo.com.br

²Professor Doutor do Instituto Federal Catarinense, Laranjeiras do Sul, PR

³Professor Doutor da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

⁴Bolsista Doutor Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

RESUMO

O sêmen de doze tourinhos da raça Tabapuã, que se apresentou após a criopreservação dentro dos padrões andrológicos estabelecidos pelo CBRA (1998), foi submetido aos testes de termorresistência rápida e lenta, hiposmótico, reação acrossômica induzida pela heparina, teste da viabilidade espermática pelo azul de tripan pós-congelação e pós-incubação com a heparina e índice de prenhez na primeira inseminação artificial de novilhas Nelore. As médias das variáveis contínuas dos testes mencionados foram comparadas pelo teste Student–Newman–Keuls e das variáveis subjetivas foram comparadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Foram estimadas correlações simples entre todas as

variáveis e estabelecidos modelos de regressão múltipla para prever o índice de prenhez em novilhas Nelore, utilizando-se sêmen de machos Tabapuã. Verificou-se que nenhuma das variáveis para avaliar a integridade das membranas em sêmen criopreservado foi isoladamente efetiva ($p > 0,05$) para prever o índice de prenhez, nem mesmo o modelo de regressão múltipla que incluía todas as variáveis. Concluiu-se que o modelo proposto neste estudo não foi efetivo para prever o índice de prenhez. O teste hiposmótico, por sua maior exequibilidade, pode ser sugerido para avaliar a integridade funcional e estrutural da membrana plasmática e capacidade das membranas acrossomais passarem pela reação acrossômica.

PALAVRAS-CHAVE: membrana espermática; reação acrossômica induzida; sêmen; teste de termorresistência; teste hiposmótico.

EVALUATION OF MEMBRANE INTEGRITY OF CRYOPRESERVED BOVINE SPERM TO PREDICT PREGANANCY RATES

ABSTRACT

Semen of twelve Tabapuã young bulls, which were according to patterns established by CBRA (1998) after cryopreservation, was submitted to fast and slow thermoresistance tests, hypoosmotic swelling test, induced acrossome reaction by heparin, sperm viability test by Trypan blue post-freezing and post-incubation with heparin, and pregnancy rates at first artificial insemination of Nelore heifers. Continuous variable averages of the mentioned tests were compared by Student–Newman–Keuls test and subjective variables were compared by Kruskal-Wallis non-parametric test ($p < 0.05$). Simple correlation among all

variables, and multiple regression models to predict pregnancy rate of Nelore heifers, using semen of Tabapuã bulls, were estimated. It was shown that none of the variables studied to evaluate membrane integrity in frozen semen was isolately effective ($p > 0.05$) to preview pregnancy rate, even if using the multiple regression model that included all variables. One can conclude that the model proposed in this study was not effective to predict pregnancy rate. Hypoosmotic Swelling Test can be suggested to evaluate functional and structural integrities of plasma membrane and the capacity of spermatozoa going through acrossome reaction.

KEYWORDS: hypoosmotic swelling test; induced acrossome reaction; semen; sperm membrane; thermoresistence test.

INTRODUÇÃO

As raças zebuínas e seus cruzamentos apresentam grande importância na formação dos rebanhos nacionais e representam cerca de 80% do efetivo bovino brasileiro. O aumento da produtividade da pecuária nacional pode ser obtido com o emprego de biotecnologias que otimizam o sistema de produção, buscando maior produção por hectare, diminuindo os custos e maximizando o uso de animais geneticamente superiores (CELEGHINI et al., 2008). Em vista disto, ocorreram grandes avanços nas biotecnologias da reprodução animal (FOLHADELLA, 2008). Nesse contexto, a criopreservação de gametas tornou-se procedimento essencial para a aplicação dessas tecnologias, pois elimina as limitações de tempo e distância (PARKS, 1997).

A demanda de sêmen criopreservado vem aumentando no Brasil nas últimas décadas em decorrência do uso cada vez mais intenso de animais geneticamente superiores nos rebanhos por meio de inseminação artificial (IA) e do maior emprego de outras técnicas como a transferência de embriões (TE) e a fertilização “*in vitro*” (FIV) (FOLHADELLA, 2008). A IA é uma das técnicas mais simples e de baixo custo empregada na reprodução animal, além de ser a que apresenta melhor resultado nos programas de melhoramento genético do rebanho, com a utilização de sêmen de reprodutores de comprovado valor genético. Apesar de sua aparente simplicidade, a IA requer criterioso e rígido controle nas suas diferentes etapas, que vão da seleção dos reprodutores doadores de sêmen, passando pelos processos tecnológicos de envasamento e criopreservação do material fecundante e pelo controle sanitário e ginecológico das matrizes, até o treinamento do inseminador (OHASHI, 2002).

Índices de fecundação obtidos pelo sêmen congelado, tanto no uso da IA quanto na FIV, têm apresentado grande variabilidade, mesmo com amostras de alta qualidade quanto à qualidade espermática pós-descongelamento, avaliada segundo técnicas convencionais como a motilidade, a concentração e os defeitos espermáticos. Apesar dos grandes avanços ocorridos na obtenção de crioprotetores mais eficientes, ainda são necessários estudos que elucidem melhor a funcionabilidade de membranas espermáticas (RODRIGUES-MARTINEZ, 2003), uma vez que a

criopreservação provoca estresse químico, osmótico, térmico e mecânico, sendo que eles são originados, principalmente, nas fases de resfriamento e descongelamento do sêmen, conduzindo à perda de em torno 50 % na viabilidade espermática (WATSON, 1995). Dessa forma, novos testes em sêmen bovino criopreservado têm sido utilizados para se avaliarem as membranas plasmática, mitocondrial e acrossomal, além da prova de resistência metabólica, na tentativa de prever com maior acurácia a qualidade do sêmen, já que os testes-padrão utilizados (motilidade, concentração e morfologia espermáticas) não são suficientes para o diagnóstico da real capacidade fecundante dos espermatozoides (ZHANG et al., 1999; RODRIGUES-MARTINEZ, 2003; MELO et al., 2005) e que as membranas espermáticas possuem funções ativas no processo de fertilização como a capacitação, reação acrossômica, hiperativação da motilidade e interação com a membrana plasmática do oócito (GADELLA et al., 2001).

Portanto, o Thos (teste hiposmótico), o TTR (teste de termoresistência) e a RAI (reação acrossômica induzida) têm sido estudados em sêmen criopreservado na tentativa de se obterem relações satisfatórias com índices de prenhez. No entanto, na literatura, tem-se observado contradição nesses resultados, pois resultados descritos por RODRIGUES-MARTINEZ (2003) e KIRK et al. (2005) demonstram que nenhum teste possui alta correlação com fertilidade, dada a complexidade da célula espermática, bem como do processo de fertilização, sendo necessária a utilização de modelos de análises de regressões múltiplas para melhor prever índices de prenhez.

Dessa forma, objetivou-se com este trabalho avaliar a qualidade de membranas espermáticas pós-criopreservação obtida por cinco testes diferentes, estimar as correlações entre as variáveis observadas incluindo-se o índice de prenhez e estabelecer o modelo de regressão para prever o índice de prenhez, utilizando-se amostras de sêmen de tourinhos Tabapuã, aos dois anos de idade, selecionados pela Classificação Andrológica por Pontos (CAP).

MATERIAL E MÉTODOS

Os tourinhos Tabapuã foram examinados quanto aos aspectos clínico-andrológicos e de

qualidade do sêmen (CBRA, 1998), determinando-se o CAP (DIAS et al., 2009). De um total de 140 animais, 18 com idade média de 23,7 meses foram destinados à criopreservação. Desses 18, apenas 12 foram utilizados no presente estudo, pois atingiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) para características do sêmen bovino pós-criopreservação.

As colheitas de sêmen foram realizadas com auxílio de aparelho eletroejaculador e as avaliações físicas (motilidade, vigor e turbilhonamento) dos espermatozoides realizadas imediatamente após as ejaculações. O sêmen foi transportado em temperatura ambiente em solução de formol-salino tamponada (HANCOCK, 1957) para posterior avaliação morfológica e as demais análises foram realizadas no Laboratório de Andrologia da Escola de Veterinária da UFMG de acordo com a metodologia do CBRA, 1998.

Os animais cujo sêmen foi destinado à criopreservação apresentaram as seguintes características: < 15% de defeitos maiores e < 25% de defeitos totais, e que, no momento da coleta, apresentaram motilidade espermática progressiva retilínea (Mot Pré) \geq que 60%, com vigor (0-5) = 5 (CBRA, 1998). A congelamento do sêmen foi realizada de acordo com ABREU (2002) (comunicação pessoal). Após essas análises, o sêmen foi diluído e envasado em palhetas tipo francesa, 0,5 mL, com o diluidor lactose-gema (CANISSO, 2008), com posterior resfriamento e equilíbrio por período de seis a oito horas, a 5°C.

Após a fase de equilíbrio, a congelamento do sêmen foi realizada por 15 minutos em vapor de nitrogênio líquido atingindo a temperatura de -120 °C com posterior imersão no mesmo. Trinta doses de sêmen foram congeladas para cada tourinho selecionado. Os critérios para aprovação do sêmen bovino pós-congelamento seguiram as recomendações do CBRA (1998). A concentração espermática, por dose envasada por palheta foi de 20 milhões de espermatozoides totais.

Os testes funcionais utilizados foram: (1) o hiposmótico (Thos); (2) a reação acrossômica induzida por heparina (RAI); (3) o teste de termoresistência lenta (TTRl); (4) teste de termoresistência rápida (TTRr); e (5) avaliação da viabilidade espermática pelo azul de tripan após a criopreservação (Txviv 0) e após a incubação com a heparina (Txviv RAI).

A metodologia para o Thos (avaliação a integridade funcional da membrana plasmática espermática) consistiu na mistura de uma alíquota

de 30 microlitros (μ L) de sêmen em 300 μ L de solução contendo citrato de sódio e frutose, a 100 mOsmol/mL, mantida a 37°C por 1 hora em banho-maria. A solução preparada foi medida em osmômetro. Após esse período, as amostras foram fixadas em 0,5mL de solução formol-salino tamponado, para leitura em microscopia de contraste de fase (BRITO et al., 2003). A interpretação foi feita da seguinte forma: o total de caudas dobradas após o Thos foi subtraído do total de espermatozoides com caudas dobradas antes da incubação, em solução hiposmótica (CORREA et al., 1997; MELO et al., 2005).

Na RAI (avaliação da capacidade das membranas acrossomais passarem pela reação acrossômica), o material descongelado e contendo sêmen com diluente foi lavado por centrifugação em meio TALP HEPES (albumina 6mg/mL, CaCl₂ 2 mM, KCl 3,1 mM, MgCl₂ 0,4 mM, NaCl 100 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, lactato de sódio 21,6 mM, NaHCO₃ 25 Mm, piruvato de sódio 1 mM), por três vezes a 300 giros por 10 minutos, para a retirada do diluente. A concentração espermática foi padronizada para todos os touros em 20 milhões de espermatozoides/mL. Após esse procedimento, o sêmen foi incubado em três tratamentos sugeridos por FELICIANO SILVA (1998):

- (1) 250 μ L sêmen + 750 μ L Talp (controle) incubados por 4 horas e 15 minutos;
- (2) 250 μ L sêmen + 650 μ L Talp + 100 μ L de heparina, incubados por 4 horas e 15 minutos;
- (3) 250 μ L sêmen + 550 μ L Talp + 100 μ L de heparina + 100 μ L de Lisofosfatidilcolina (LPC) adicionado depois de 4 horas, permanecendo por até 15 minutos de incubação.

Após essas incubações e no tempo zero (logo após o descongelamento do sêmen), a viabilidade espermática e a integridade do acrossoma foram avaliadas pelo método azul tripan e giemsa, respectivamente, adaptado de FELICIANO SILVA (1998). Para tal, primeiramente, o sêmen foi incubado com o azul de tripan em banho-maria por um período de 15 minutos. Após essa incubação, o azul de tripan foi retirado por três centrifugações sucessivas a 300 g por dez minutos, quando, então, foi ressuspensionado por 100 μ L em meio Talp Hepes. Posteriormente, uma gota foi obtida e colocada sob uma lâmina para realização do esfregaço, sendo que para cada amostra foram realizados três esfregaços. A concentração do azul de tripan foi de 0,4 % e do

giemsa foi de 0,8 % diluídos em água destilada, sendo que o giemsa foi utilizado diretamente sob esfregação na lâmina durante um período de 60 minutos. A concentração de heparina foi 50 µg/mL e o LPC, 100 µg/mL (SALVADOR et al., 2008).

A fórmula usada para a interpretação da RAI foi a seguinte:

$$RAI = ((F3/(F2+F3) \times 100) - ((C3/(C3+C2) \times 100));$$

em que:

F3= % de vivos com acrossoma reagido após 4: 15 h de incubação;

F2= % de vivos com acrossoma íntegro após 4: 15 h de incubação;

C3= % de vivos com acrossoma reagido logo após descongelamento do sêmen;

C2= % de vivos com acrossoma íntegro logo após descongelamento do sêmen;

Para o TTR_r, o sêmen após descongelamento foi mantido em tubo de ensaio de 5 mL à temperatura de 45°C, durante meia hora. Para o TTR_I, o sêmen foi descongelado em banho-maria a 38 °C por 30 segundos e, posteriormente, mantido em tubo de ensaio a 38°C, durante quatro horas. Para ambos, o sêmen foi avaliado em intervalos de 15 minutos, para se detectarem quedas sucessivas da motilidade e do vigor espermático. Ao final, as amostras de sêmen foram fixadas em formol salina, para avaliação da morfologia espermática depois das respectivas incubações (ARRUDA et al., 1992).

O sêmen dos doze tourinhos foi utilizado em novilhas para obtenção do índice de prenhez (IP) e submetidos aos testes funcionais, de acordo com parâmetros mínimos exigidos pelo CBRA (1998). O IP foi avaliado em quatro novilhas Nelore, por touro, inseminadas artificialmente, utilizando-se somente um ciclo estral por novilha.

As novilhas foram mantidas numa fazenda de 300 ha, no município de Carlos Chagas (MG), com boas pastagens (*Panicum maximum* e *Brachiaria decumbens*), aguada e mineralização à vontade. As novilhas tinham 24 meses de idade e peso de 400 kg, com escore corporal (1-9) = 6 no início do trabalho. Foram sincronizadas somente aquelas detectadas com ovulação, após avaliação clínico-ginecológica por palpação retal. O método de sincronização utilizado foi o de dupla aplicação de prostaglandina F_{2α} (ciosin®) intervaladas de cinco dias. A inseminação artificial (IA) foi realizada de acordo com a detecção do cio. O diagnóstico de gestação foi efetuado 60 dias após a

IA, pelo método de palpação retal.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso. Foram estimados coeficientes de correlação entre as variáveis testadas, incluindo-se o IP e ajustados diversos modelos de regressão para prever o IP em função dos resultados obtidos nos testes para avaliar a integridade de membrana e características andrológicas, utilizando-se o programa SAEG (2004).

Finalmente, as médias dos resultados das variáveis obtidas nos testes funcionais foram comparadas entre si utilizando-se o teste SNK. As médias das variáveis de Mot Pós e de ambos os TTR foram comparadas utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, ao nível de significância de 5% (SAMPAIO, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apresentam-se na Tabela 1 os perfis zootécnicos e andrológicos dos doze tourinhos Tabapuã usados neste experimento, bem como os dados do sêmen pré- e pós-congelamento. Observa-se que este grupo de tourinhos Tabapuã, aos dois anos de idade, apresenta sêmen com alta qualidade, no pré- e no pós-congelamento, caracterizados pelas altas Mot Pré e Mot Pós (65,4 e 38,1%) e vigor (1-5= 5), e pela baixa quantidade de espermatozoides anormais no pré-congelamento, possuindo defeitos maiores (DM) e totais (DT), 10,6 % e 16,0 %, respectivamente. O peso corporal, circunferência escrotal (CE) e classificação andrológica por pontos (CAP) foram respectivamente de 412,0 Kg; 31,2 cm e 80,8 pontos, sendo também considerados valores altos para a idade desses animais, sendo, pois, de se esperar alto IP, pelo seu uso na inseminação artificial (IA).

Entretanto, não foi observada correlação significativa entre a CAP e a Mot Pós. Esse resultado está de acordo com os de SALVADOR et al. (2008). Talvez, a explicação para isso seja o fato de que a alta qualidade do sêmen (verificada pela alta motilidade, baixos defeitos maiores e menores espermáticos), bem como a CE, sejam características indispensáveis à criopreservação de sêmen. Em outras palavras, como não há variabilidade entre características pós-congelamento, não é possível de se detectar correlação significativa, uma vez que animais com baixas qualidades do sêmen pós-congelamento são descartados desse tipo de experimento.

Tabela 1 – Perfil zootécnico, andrológico e de congelabilidade do sêmen de 12 tourinhos Tabapuã, com dois anos de idade, criados a pasto, previamente selecionados pelo CAP e pela qualidade do sêmen pós-criopreservação

Touro	Idade (mês)	Peso (Kg)	CE (cm)	Conc. ($\times 10^6/\text{mL}$)	Tur. (1-5)	Mot Pré (%)	DM (%)	Dm (%)	DT (%)	CAP (0-100)	Mot Pós (%)
D	23	450	30,1	660	4	70	9	5	14	100	45
G	23	420	34,2	150	5	70	8	5	13	100	30
L	25	412	35,2	690	5	70	8	5	13	100	60
H	22	400	30,1	310	4	70	15	6	21	85	30
C	25	410	31,0	280	4	70	8	10	18	84	50
J	26	430	32,5	162	5	70	9	2	11	84	30
M	24	460	31,0	195	4	70	9	2	11	84	30
B	23	440	31,0	295	3	60	11	8	19	77	30
F	26	400	31,5	410	5	60	9	6	15	76	30
A	25	440	30,5	312	3	60	14	2	16	61	50
E	21	350	28,8	460	4	60	11	10	21	61	30
I	22	380	29,0	141	4	60	15	3	18	61	45
$\bar{X}_{=12}$	23,7	412	31,2	338,7	4,16	65,8	10,5	5,2	15,7	80,8	38,1

CE: circunferência escrotal; Conc.: concentração; Tur.: turbilhonamento; Mot Pré: motilidade retilínea progressiva; DM: defeitos espermáticos maiores; Dm: defeitos espermáticos menores; DT: defeitos espermáticos totais, CAP: classificação andrológica por pontos; Mot Pós: motilidade retilínea progressiva após a criopreservação do sêmen.

Na Figura 1 são apresentadas as comparações entre os resultados obtidos com os TTRs e a Mot Pós. A Mot Pós diferiu ($p < 0,05$) quando comparados aos demais testes. Esse resultado sugere que os TTRs são mais sensíveis em relação à Mot Pós, trazendo

informação adicional na avaliação de sêmen bovino criopreservado, uma vez que os resultados daqueles foram menores ($p < 0,05$). Vale ressaltar que, neste estudo, nenhum resultado observado para qualquer dos testes foi correlacionado ($p > 0,05$) com o IP.

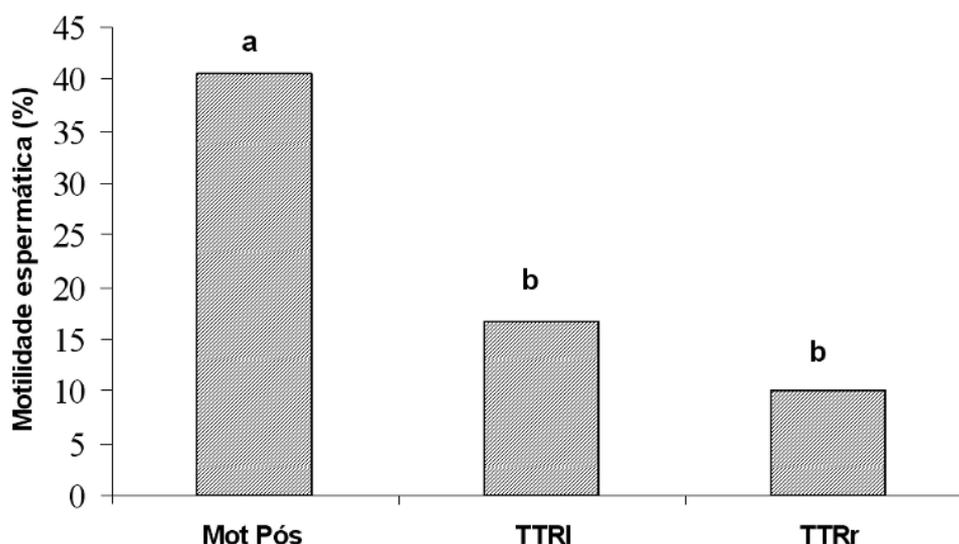


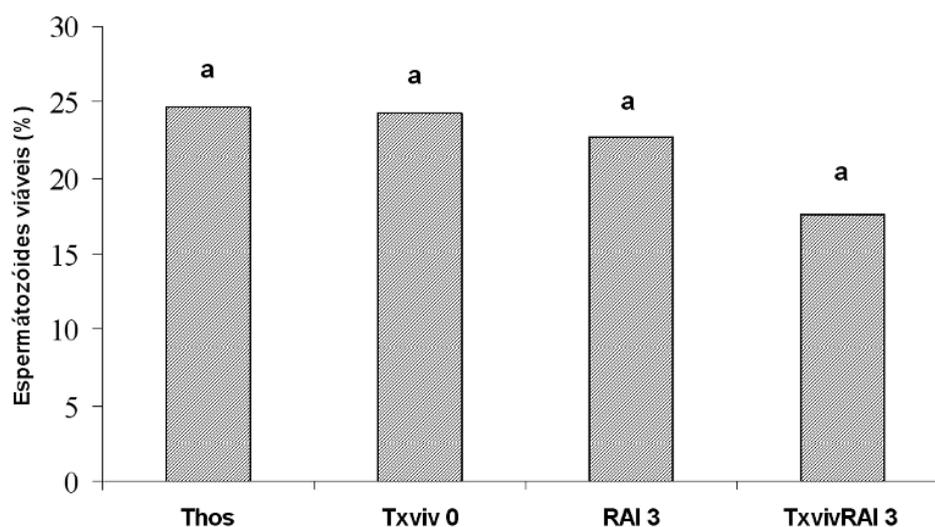
Figura 1 – Comparação entre a motilidade retilínea progressiva e os testes de termorresistência lenta e rápida (TTRr e TTRI), em sêmen criopreservado de tourinhos Tabapuã aos dois anos de idade selecionados pela CAP.

O TTRr (10,1 %) não diferiu do TTRI (16,7 %) ($p>0,05$), podendo ser recomendada a utilização do TTRr, por requerer menor tempo na sua determinação em amostras de sêmen bovino criopreservado com boa recuperação pós-descongelamento, uma vez que esse resultado foi semelhante ao observado por ARRUDA et al. (1992), que trabalharam com sêmen a fresco.

Na Figura 2 são apresentadas as comparações entre os testes funcionais de membrana. O Thos (24,7 %), a TxvivRAI (17,6%), a Txviv 0 (24,3 %) e o RAI (22,7 %) não apresentaram diferenças ($p>0,05$). Esses resultados sugerem que um teste pode ser utilizado como preditor do outro apesar de avaliarem diferentes aspectos das membranas espermáticas. O teste hiposmótico avalia a função da bomba de sódio e potássio, importante na passagem de água através da membrana (integridade funcional da membrana plasmática) (JEYENDRAN et al., 1984; CORREA & ZAVOS, 1994). O RAI avalia a

capacidade das membranas acrossomais interna e externa passarem pela capacitação e reação acrossômica após incubação com heparina (FELICIANO SILVA, 1998; ASSUMPCÃO et al., 2002) e os TxvivRAI e o Txviv avaliam a passagem do corante azul de Tripán pela bicamada lipídica (integridade estrutural da membrana plasmática) (VAZQUEZ et al., 1996).

Dessa forma, por qualquer método de avaliação da integridade da membrana, pode se determinar a viabilidade da mesma, já que, havendo alterações em sua estrutura, sua funcionalidade e a capacidade de haver reação acrossômica são também comprometidas, pois, com a formação de poros através da mesma, sua constituição e permeabilidade são alteradas afetando a fusão entre as membranas plasmática e acrossomal externa e a ação das bombas de sódio e potássio, respectivamente (WATSON, 1995).



Thos: teste hiposmótico; Txviv 0: % sptz vivos pelo método azul de tripan logo após o descongelamento das amostras de sêmen; RAI 3: % de sptz vivos com acrossoma reagido logo após o tratamento com sêmen+Talp-hepes+heparina+LPC; TxvivRAI 3: % sptz vivos pelo método azul de tripan após o tratamento com sêmen +Talp-hepes+heparina+LPC.

Figura 2 - Comparação entre os testes que avaliam a integridade das membranas espermáticas em sêmen criopreservado de tourinhos Tabapuã de dois anos de idade.

A não diferença observada ($p>0,05$) entre os resultados do RAI 3, Txviv 0 e TxvivRAI 3 corroborou as observações de PARRISH et al. (1985). Esse resultado é esperado, porque na fórmula da interpretação da RAI são considerados apenas os espermatozoides vivos após a incubação com a heparina, pois tem sido descrito na literatura que espermatozoides submetidos à capacitação e visualizados como mortos sem acrossoma são

denominados de falsa reação acrossômica (GADELLA et al., 2001).

FELICIANO SILVA (1998), trabalhando com sêmen a fresco, observou valores do RAI, para grupos de baixa e alta fertilidade, de 14 e 34 %, respectivamente, sugerindo que o sêmen de animais que possuem maiores resposta de reação acrossômica estimulada pela heparina são aqueles que possuem maior fertilidade. Talvez a explicação para isso seja

o fato de que proteínas ligadoras de heparina são necessárias para que essa exerça sua função de capacitação e reação acrossômica, visto que tem sido reportado que animais que possuem maiores concentrações de tais proteínas no plasma seminal são aqueles potencialmente mais férteis (FOLHADELLA, 2008).

Neste experimento, o resultado obtido para o RAI foi próximo (22,7 %) aos animais do grupo de alta fertilidade, como reportado por FELICIANO SILVA (1998). Esse resultado reforça a idéia de que o sêmen criopreservado utilizado neste experimento foi de alto poder fecundante e, ainda, que o RAI pode ser considerado como um importante teste funcional de membranas acrossômicas, relevante para indicar não somente a fertilidade do sêmen fresco de um touro como também a congelabilidade e fertilidade do sêmen criopreservado.

Tem sido relatado que animais com alta prevalência de espermatozoides com defeitos de acrossoma "knobbed" possuem reduzida fertilidade. Entretanto, permanece sem ser esclarecido se essa redução na fertilidade se deve à falha na interação entre o espermatozóide e a zona pelúcida dada a incompetência de receptor, ou à inabilidade funcional da membrana espermática, impossibilitando-a de adquirir a hiperativação da motilidade (SAACKE et al., 1994), ou à exocitose inadequada do conteúdo acrossomal devido à alteração na forma acrossomal ou, ainda, à falha na capacitação e reação acrossômica (THUNDATHIL et al., 2000).

Dessa forma, nesse experimento foi observada alta correlação negativa entre os defeitos de acrossoma pré-congelação e o RAI ($r = -0,62$ $p < 0,05$), sugerindo que, pelo menos parcialmente, a incapacidade de ocorrer reação acrossômica seja uma das explicações para a reduzida fertilidade em espermatozoides com acrossoma "Knobbed". Sabe-se que esse defeito de acrossoma é o mais prevalente logo após a coleta de sêmen, visto que são defeitos oriundos da espermiogênese e que as membranas espermáticas não foram submetidas à injúria. Entretanto, vale ressaltar que esse resultado está em desacordo com THUNDATHIL et al. (2002), pois eles observaram que o sêmen de animais com alta incidência de defeito de acrossoma "Knobbed" possuíam maior porcentagem de espermatozoides com acrossoma reagido.

A criopreservação provoca alterações semelhantes à capacitação no espermatozóide bovino, desestabilizando a membrana plasmática tornando-a mais sensível (GADELLA et al., 2001). O defeito de acrossoma "Knobbed" resulta de espermiogênese imperfeita, seja por fatores ambientais ou genéticos. Alta prevalência de defeitos

oriundos da espermatogênese indica que há falhas nesse processo, podendo acarretar o desenvolvimento anormal da estrutura das membranas espermáticas (BLOM & BIRCH-ANDERSON, 1962), tornando-as mais sensíveis, requerendo, assim, menor tempo para capacitação. Esses fatos contribuem para explicar a divergência nos resultados observados entre este experimento e o de THUNDATHIL et al. (2002), referente à relação entre o RAI e o defeito de acrossoma, uma vez que esses autores trabalharam com sêmen criopreservado e a metodologia para a RAI foi o tempo de incubação de duas horas com a heparina, ou seja, o tempo de incubação foi mais curto e a membrana, provavelmente, mais sensível, propiciando maior reação acrossômica sem ter ocorrido a morte desses espermatozoides. Talvez, se esse autor tivesse trabalhado com quatro horas de incubação, a maioria dos espermatozoides tivesse morrido, ocorrendo, assim, apenas a falsa reação acrossômica.

TARTAGLIONE & RITA (2004) também registraram valores próximos entre o Thos e a taxa de espermatozoides viáveis pelo método azul de tripan/giensa, sendo de 58,8 e 51,2 %, respectivamente, corroborando o presente estudo. VAZQUEZ et al. (1996) e BRITO et al. (2003) observaram diferenças entre os corantes vitais (azul de tripan) e o Thos ($p < 0,05$). Neste experimento as médias de Thos e Txviv 0 foram de 24,7 e 24,3 %, respectivamente. Esses valores foram a metade daqueles reportados em todos os estudos supramencionados (≈ 50). Tem sido reportado na literatura que, à medida que se aumenta a idade, ocorre também um aumento no percentual de células espermáticas com membrana intacta quando o espermatozóide é submetido ao processo de criopreservação, mesmo que o sêmen se encontre normal e com alta qualidade sob o ponto de vista morfológico. Talvez o aumento da competência estrutural e funcional associada à capacidade de crioresistência possa estar relacionado ao volume da cabeça do espermatozóide detectada pela análise morfométrica, uma vez que esse diminui com o avanço da idade e as características indicativas de boa congelabilidade aumentam (MARTÍ et al., 2011). Esse fato pode contribuir para explicar as diferenças nos resultados obtidos neste experimento e naqueles, visto que nos últimos foram utilizados touros *Bos taurus taurus* a partir de dois anos de idade, sendo que esses animais são considerados mais precoces e possuem melhor congelabilidade quando comparados a animais *Bos taurus indicus* (ANCHIETA et al., 2005).

Nos trabalhos citados anteriormente, não foram apresentados os métodos de criopreservação; portanto, dada a importância na qualidade de sêmen

criopreservado, as diferenças entre o tipo diluidor e o tempo de equilíbrio utilizados neste trabalho e naqueles também não podem ser descartadas, pois são importantes para que ocorra adequada interação entre as lipoproteínas do meio e a membrana plasmática e a manutenção da pressão osmótica necessária para que ocorra adequadas troca de fluidos entre o meio intra e extra celular, evitando formação de grandes cristais de gelo, principalmente no interior da célula, que provocam lesões graves nas membranas espermáticas (LEITE et al., 2010).

TARTAGLIONE & RITA (2004) reportaram que o Thos avalia a integridade funcional da membrana plasmática na cauda do espermatozóide. A correlação entre esse teste e a Mot Pós, o TTRl e o TTRr foram de 0,76, 0,78 e 0,69 ($p < 0,05$), respectivamente. Tais resultados suportam essa hipótese, uma vez que a grande parte das mitocôndrias responsáveis pela geração de ATP essencial para o batimento flagelar, necessária para aquisição e manutenção da motilidade espermática, situa-se na peça intermediária (CELEGHINI et al., 2008). Vale ressaltar que esse resultado e aqueles registrados na figura 2 sugerem que, apesar da compartimentalização da célula espermática (regiões acrossômica, pós acrossômica e cauda), uma vez que ocorre uma injúria em alguma porção da membrana plasmática, essa pode ocorrer ao longo de toda a célula; portanto, a lesão pode não ser localizada ou ainda a alteração na membrana plasmática espermática em qualquer porção pode alterar de alguma forma a função da célula.

Na tabela 2 são apresentados os resultados do sêmen criopreservado de tourinhos Tabapuã com dois anos de idade, que foram usados na IA, com obtenção do IP médio de 48 %. Foram formados dois grupos de IP ($>$ ou $<$ do que 50 %), de acordo com

CORREA et al (1997), comparando-os com parâmetros de avaliação de sêmen pós-descongelamento e os testes funcionais realizados. Como pode ser verificado, não houve diferença ($p > 0,05$) entre as variáveis estudadas nos dois grupos de touros quanto ao IP, desde que foram preservados os valores mínimos preconizados pelo CBRA (1998) para sêmen criopreservado, para se obter índices satisfatórios de prenhez, como obtido neste experimento.

Esses resultados não estão de acordo com os encontrados por CORREA et al. (1997), que observaram diferenças ($p < 0,05$) para Mot Pós, morfologia espermática, integridade de acrossoma e Thos, em relação a grupos de alta e de baixa fertilidade. Entretanto, vale ressaltar que esses autores trabalharam com taxa de não retorno aos 56 dias utilizando cio natural. Esses resultados também contrastam com os reportados por FELICIANO SILVA (1998), que trabalhou com monta e cio natural e encontrou diferença ($p < 0,05$) entre a RAI de grupos com fertilidade superior (IP= 84 %) e inferior (IP= 65 %), porém estão de acordo com os obtidos por ASSUMPCÃO et al. (2002). É possível que o fato de se ter usado sêmen criopreservado de tourinhos Tabapuã aos dois anos de idade, somente na primeira IA, em novilhas com o cio sincronizado pela PGF2 α , e o tamanho da amostra utilizada neste estudo possam explicar o resultado contrastante observado neste experimento em relação aos autores mencionados. Esses resultados sugerem que existem outros fatores extra à qualidade do sêmen, sobretudo, a preservação das membranas espermáticas pós-criopreservação, não avaliadas neste experimento, que influenciam a fecundação e o desenvolvimento embrionário precoce.

Tabela 2- Testes funcionais em grupos de sêmen criopreservado IP $>$ ou $<$ que 50 % em tourinhos Tabapuã, com dois anos de idade, criados a pasto

Grupos	Thos	Mot Pós	RAI	Pós-descongelação		Pós TTR rápido (38 °C/4h)		Pós TTR lento (45°C/30')	
				DM	DT	DM	DT	DM	DT
IP>50%(67,5a)	22,8 (a)	37,14 (a)	21,8 (a)	9,8 (a)	20,4 (a)	18,2 (a)	22,6 (a)	17,8 (a)	31,4 (a)
IP<50%(20,0b)	19,2 (a)	37,0 (a)	27,6 (a)	12,4 (a)	21,4 (a)	15,6 (a)	23,4 (a)	14,2 (a)	24,6 (a)

Thos: teste hiposmótico; Mot Pós: motilidade imediatamente pós-descongelamento; Pós TTRr: teste de termorresistência rápido; Pós TTRl: teste de termorresistência lento; DM: defeitos espermáticos maiores; DT: defeitos espermáticos totais; IP: índice de prenhez; Médias acompanhadas por letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente ($p < 0,05$), pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para o IP foi utilizado o teste de Fisher.

Nenhuma característica analisada correlacionou-se ($p > 0,05$) com IP, sendo o mesmo foi encontrado por ZHANG et al. (1999) e BRITO et

al. (2003). As análises das equações de regressões múltiplas indicaram que o coeficiente de determinação aumentou progressivamente, à medida

que foram acrescentadas ao modelo mais características a serem avaliadas. A inclusão de todas as variáveis explicativas no modelo, porém, não explicou significativamente as variações no IP, apesar de o modelo apresentar coeficiente de

determinação $R^2 = 0,83$ (Tab. 3). Resultados prévios reportados por ZHANG et al. (1999) e KIRK et al. (2005) também indicam melhora na capacidade preditiva dos modelos para o índice de prenhez quando novas variáveis laboratoriais são acrescentadas.

Tabela 3 – Resultado das análises de regressão e seus respectivos níveis de significância utilizando o TTRr, o Thos, a RAI 3, a Mot Pós, o DMpré e o DTpré, avaliados separadamente ou em conjunto para prever o índice de prenhez a campo

Variável	Coefficiente de determinação (R^2)	Nível de significância (valores de p)
TTRr.	0,15	0,01
TTRr+Thos	0,16	0,17
TTRr+Thos+RAI	0,44	0,02
TTRr+Thos+RAI +Mot Pós	0,52	0,1
TTRr+Thos+RAI +Mot Pós+DMpré	0,52	0,67
TTRr+Thos+RAI +Mot Pós+DMpré+DTpré*	0,83*	0,15

* FERTILIDADE PREDITA = $148,83 - 0,178TTRr + 3,406Thos + 4,187RAI - 6,541Mot\ pós - 16,508DM + 7,761DTOT$ ($R^2 = 0,83$); Sendo que DMpré: defeitos espermáticos maiores pré-congelação; DTpré: defeitos espermáticos totais pré-congelação.

Dessa forma, visualiza-se a complexidade dos eventos ligados à fertilidade e à célula espermática, que envolvem diferentes fatores e podem explicar, parcialmente, a não significância do modelo de regressão mesmo com R^2 alto (0,83), por existirem outros fatores envolvidos e que não foram controlados no presente estudo. A utilização de maior número de fêmeas poderá permitir avaliar com melhor precisão o efeito das variáveis, por diminuir o “erro” experimental.

CONCLUSÃO

O modelo de regressão múltipla proposto, baseado em características que representam a integridade das membranas espermáticas, não foi efetivo para prever o índice de prenhez em novilhas Nelore inseminadas com sêmen criopreservado de machos Tabapuã aos dois anos de idade com cio sincronizado pela PGF2 α .

O Thos, pela maior facilidade de execução e maior repetibilidade de resultado, pode ser indicado para a avaliação rotineira de amostras de sêmen criopreservado e para avaliar a integridade das membranas espermáticas monitorando a qualidade da criopreservação do sêmen.

REFERÊNCIAS

ANCHIETA, M.C.; VALE FILHO, V.R.; COLOSIMO, E.; SAMPAIO, I.B.M.; ANDRADE, V.J.. Descarte e congelabilidade do sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.196-204, 2005.

ARRUDA, R. P.; BARNABE, V. H.; ALENCAR, M. M.; BARNABE, R. C. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, n. 1, p. 131-137, 1992.

ASSUMPTÃO, M.E.O.D.A.; HAIPEK, K.; LIMA, A.S.D.; MELLO, M.R.B.D.; OLIVEIRA, L.J.D.; OLIVEIRA, V.P.D.; TAVARES, L.M.T.; VISINTIN, J.A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.3, p.149-156, 2002.

BLOM, E.; BIRCH-ANDERSON, A. Ultrastructure of sterilizing knobbed acrosome defect in the bull. **Nature**, v.194, p.989-990, 1962.

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILLODEAU-GOESSELS, S.; PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P.. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003.

CANISSO, I.F.. **Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga**. 2008. 189f. Dissertação (Mestrado em ciência animal). Escola de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, em: http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_arquivos/2/TDE-2009-06-15T085325Z-1671/Publico/texto%20completo.pdf.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal**

Reproduction Science, v. 104, p. 119-131, 2008.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.

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

CORREA, J.R.; PACE, M.M., ZAVOS, P.M. Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v.48, p.721-731, 1997.

DIAS, J. C.; ANDRADE, V. J.; MARTINS, J. A. M.; EMERICK, L. L.; GONÇALVES, P. E. M.; VALE FILHO, V. R.. Classificação Andrológica por Pontos (CAP) de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) de dois e três anos de idade, criados sob pastejo. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p.1094-1099, 2009.

FELICIANO SILVA, A. E. D. **Reação acrossômica induzida**: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 38p. (Embrapa Recursos Genéticos, Documentos, 35).

FOLHADELLA, I.D.M. **Perfil protéico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir**. 2008. 51f. Tese (Doutorado em ciência animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, (disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/SSLA-7TWGJ>).

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.H.M.; STOUT, T.A.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.249-265, 2001.

HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of Royal Microbiology Society**, v.76, p.84-97, 1957.

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

KIRK, E.S.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.64, p.1422-1439, 2005.

LEITE, T.G.; VALE FILHO, V.R.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, F.C.; EMERICK, L.L.; ZAFFALON, F.G.; MARTINS, J.A.M.; ANDRADE, V.J.. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull

semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v.120, p.31-38, 2010.

MARTÍ, J.I.; APARICIO, I.M.; GARCÍA-HERREROS, M.. Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. **Theriogenology**, v.75, p.473-481, 2011.

MELO, M.I.V.; HENRY, M.; BEKER, A.R.C.L.. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.757-763, 2005.

OHASHI, O. M. Inseminação artificial em bubalinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 1.ed. São Paulo: Varela, 2002. p. 97-110.

PARKS, J.E. Hypothermia and Mammalian gametes, In: KAROW, A.M.; CRITSER, J.K. (Ed.) **Reproduction Tissue Banking: Scientific Principles**. San Diego: Academic Press, 1997. p.229-261.

RODRIGUES-MARTINEZ, H. Laboratory Sêmen Assessment and Prediction of Fertility: Still Utopia? **Reproduction of Domestic Animals**, v.38, p.312-318, 2003.

SAACKE, R.G.; NADIR, S.; NEIBEL, R.L.. Relationship of semen quality to sperm transport, fertility and embryo quality in ruminants. **Theriogenology**, v.41, p.45-50, 1994.

SALVADOR, D. F.; ANDRADE, V.J.; VALE FILHO, V.R.; DIAS, J.C.; NOGUEIRA, L.A.G.. Associação entre o perfil andrológico e a congelamento 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.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2.ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2002. 265p.

SISTEMA DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS E GENÉTICAS – SAEG. **Manual do usuário**. Viçosa, MG: UFV, 2001, 301p.

THUNDATHIL, J.; MEYER, R.; PALASZ, A.T.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine spermatozoa on IVF and embryo production. **Theriogenology**, v.54, p.921-934, 2000.

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

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

ZHANG, B.R. LARSSON, B., LUNDEHEIM, N.; assessments of frozen-thawed semen from young dairy
HAARD, M.G.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. bulls entering an AI- Programme. **International**
Prediction of bull fertility by combined in vitro **Journal of Andrology**, v.22, p.253-260, 1999.

Protocolado em: 30 abr. 2010. Aceito em: 31 maio 2011-05-31