

UNIVERSIDADE DE UBERABA
DENISE MARTINS REIS

INFLUÊNCIA DO TESTE DE TERMORRESISTÊNCIA RÁPIDO SOB O
ESPERMATOZOIDE BOVINO, PÓS-DESCONGELAMENTO

UBERABA, MG

2020

DENISE MARTINS REIS

INFLUÊNCIA DO TESTE DE TERMORRESISTÊNCIA RÁPIDO SOB O
ESPERMATOZOIDE BOVINO, PÓS-DESCONGELAMENTO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos.

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Costa Venturini

UBERABA, MG

2020

i

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

R277i Reis, Denise Martins.
Influência do teste de termorresistência rápido sob o espermatozoide bovino, pós-descongelamento / Denise Martins Reis. – Uberaba, 2020.
35 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação.

Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos.

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Costa Venturini.

I. Bovinocultura. 2. Bovino – Sêmen. 3. Fertilidade. 4. Células – Membranas. I. Vasconcelos, André Belico de. II. Venturini, Guilherme Costa. III. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. IV. Título.

CDD 636.2

DENISE MARTINS REIS

INFLUÊNCIA DO TESTE DE TERMORRESISTÊNCIA RÁPIDO SOB O
ESPERMATOZOIDE BOVINO, PÓS-DESCONGELAMENTO.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 14/12/2020

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos - Orientador
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Mauricio Scoton Igarasi
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti
Universidade Federal de Uberlândia

Ao meu marido Hugo, aos meus pais Joel e Vani, minhas irmãs e aos amigos pelo apoio e incentivo ao longo desta trajetória. Em especial, às minhas filhas Giovana e Laura, razão da minha vida e de todas as minhas conquistas.

Com amor, dedico!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos** que me depositou um voto de confiança, esteve presente em todos os momentos e principalmente, por não desistir de mim. Um exemplo de ser humano, calmo, paciente e acima de tudo, dedicado à pesquisa e aos alunos.

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Guilherme Costa Venturini** por toda a ajuda, paciência e ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti** pelo carinho e disposição ao aceitar me ajudar com o projeto, dispondo do seu tempo e abrindo as portas do laboratório para a realização dos experimentos.

Ao **Prof. Dr. Bruno Nassif Travençolo** pela ajuda com os programas de análises das imagens computacionais.

A **Deus**, por me dar força, permitir a realização deste projeto e concluir esta etapa importante da minha vida acadêmica.

À **Universidade de Uberaba (UNIUBE)**, instituição responsável por toda minha formação acadêmica, a qual tenho muito carinho e gratidão.

À **Universidade Federal de Uberlândia (UFU)**, instituição que me deu a oportunidade, através do programa Quali UFU, de conseguir realizar o mestrado, além de disponibilizar o laboratório para que eu pudesse executar minha pesquisa.

À **Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)**, laboratório do **Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira**, pelo auxílio com os experimentos do projeto.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1. Estrutura do espermatozoide bovino..... 12

Figura 2. Fluxograma do protocolo Experimental: obtenção do sêmen (descongelamento, 36⁰C por no mínimo 30 segundos); Grupo Controle (C); Grupo Experimental (E). Análise por microscopia de campo claro (10x); Análise por citometria de fluxo; Azul de toluidina (avaliação da cromatina). 21

CAPÍTULO II

Figura 1. Representação gráfica da distribuição pontual da seleção do espermatozoide bovino, pós-descongelamento, dos grupos Controle e Experimental, marcados com: Q1 - Iodeto de propídio (IP); Q2 - marcação dupla Iodeto de propídio (IP) e PNA – Fitc; Q3 – PNA-Fitc; Q4 sem marcação (espermatozoides viáveis)..... 33

Figura 2. Resultado da média e desvio padrão da motilidade total e vigor das amostras de espermatozoides bovinos, pós-descongelamento (36⁰C) Grupo Controle (C) e após o teste de termorresistência (46⁰C / 30min), Grupo Experimental (E). Significância estatística (P < 0,05)..... 33

Figura 3. Análise experimental dos testes de citometria de fluxo dos Grupos Controle (C) e experimental (E). Q1 (IP positivo) porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática reativa; Q2 (IP positivo/PNA positivo) porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal reativas; Q3 (PNA positivo) porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras; Q4 (IP negativo/PNA negativo) porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal reativa. Significância estatística (P < 0,05)..... 33

Figura 4. Análise experimental da heterogeneidade e descompactação da cromatina dos Grupos Controle (C) e Experimental (E). Sem diferença estatística (P > 0,05)..... 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

x	Vezes
%	Porcentagem
µL	Microlitros
°C	Graus Celsius
AA	Alaranjado de Acridina
AT	Azul de Toluidina
ASBIA	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
CFDA	6-carboxifluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FIT-PSA	Isotiocianato de fluoresceína associado à aglutinina do <i>Pisum sativum</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IP	Iodeto de Propídio
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,10,3,30-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
OECD	Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico
PIB	Produto Interno Bruto
PNA-Fitc	Isotiocianato de fluoresceína associado à aglutinina do <i>Arachis hypogaea</i>
R123	Rodamina 123
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
TTR	Teste de Termorresistência
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Estrutura espermática	12
2.2 Avaliação de termorresistência	14
2.3 Avaliação microscópica	15
2.4 Técnicas de avaliação	16
- Citometria de fluxo.....	16
- Avaliação da integridade do DNA	17
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 - Objetivo geral.....	20
3.2 - Objetivos específicos	20
4. FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS	21
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO II.....	27
Resumo	27
Abstract.....	27
INTRODUÇÃO.....	28
MATERIAL E MÉTODO	29
Obtenção das amostras de sêmen bovino	29
Preparação Espermática.....	29
Avaliações espermáticas	30
Estatística	32
RESULTADOS	32
DISCUSSÃO	34
CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS	36

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, no cenário mundial do agronegócio e da pecuária, ganhou posição de destaque nos últimos anos e sua importância econômica no crescimento do Produto Interno Bruto (PIB), bem como na geração de emprego e renda é inquestionável (GOMES et al., 2017). Nesse contexto, a inseminação artificial com amostras de animais geneticamente superiores vem ganhando destaque, tanto assim que o país vem obtendo excelentes resultados na comercialização de sêmen bovino criopreservado. No período de janeiro a setembro de 2020, apresentou um crescimento de 30,1% de doses de sêmen comercializadas, se comparado ao mesmo período do ano anterior, ou seja, 2019, de acordo com os dados da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA).

Visto que é extremamente necessário que o sêmen seja de boa qualidade para se obter uma elevada fertilidade do rebanho, intensificou-se a utilização de técnicas no âmbito da tecnologia de sêmen, com vistas a alcançar melhores resultados na capacidade de reprodução dos machos. Na verdade, a tecnologia de avaliação de sêmen é apontada como uma ferramenta de extrema importância aos programas de melhoramento genético e eficiência na produção dos produtos de origem animal (COUTINHO et al., 2010).

A análise do sêmen e a fertilidade dos touros no desempenho reprodutivo do rebanho tem uma relevância significativa para a bovinocultura, pois a baixa fertilidade tem impacto direto na produtividade do sistema e o tempo que se leva em seu diagnóstico e busca de soluções tendem a causar prejuízos significativos para o produtor (CELEGHINI et al., 2017).

Pela importância deste segmento para a economia em nível internacional e nacional, foram desenvolvidas técnicas para auxiliar na análise da qualidade e problemas do sêmen bovino, uma vez que as biotecnologias, associadas à análise da reprodução animal, auxiliam no aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos (SANTOS et al., 2018). Dentre as técnicas disponíveis convém chamar a atenção para o teste de termorresistência, a citometria de fluxo, a microscopia confocal de varredura e análise de integridade do ácido desoxirribonucleico (DNA).

Assim, a avaliação da fertilidade dos machos e de métodos mais precisos no diagnóstico e exames andrológicos é essencial, contudo, faz-se necessário também a análise da estrutura interna das células espermáticas em conjunto com a avaliação da termorresistência, no sentido de conhecer e analisar o comportamento, a capacidade de

resistência e o resultado final dos espermatozoides *in vitro*. Desta forma, torna-se relevante a utilização dos métodos de análise por citometria de fluxo e de análise do DNA, concomitante ao teste de termorresistência rápido, o qual tem contribuído para a avaliação da resistência do sêmen ao aquecimento (SIQUEIRA, 2007).

Os testes de termorresistência rápido (TTR) são utilizados na avaliação da fertilidade do sêmen congelado, pois a permanência do sêmen em banho-maria se aproximaria das condições em que o mesmo fica exposto no trato genital das fêmeas (CUNHA et al., 2012).

A Citometria de fluxo possibilita avaliar não apenas a qualidade do sêmen, bem como alterações espermáticas frente a danos genéticos (VILLADIEGO, 2018). Já a análise do DNA é uma das técnicas utilizadas quanto à análise da compactação da cromatina e morfologia da cabeça espermática, pela utilização do corante azul de toluidina (AT), cuja vantagem está na simplicidade e sensibilidade do teste (ALVES et al., 2015).

Desta forma, foi avaliado se o teste de termorresistência rápido atua sob os aspectos morfofuncionais das membranas e qualidade da cromatina de espermatozoides pós-descongelados, pois os resultados podem apontar possíveis alterações na estrutura da célula espermática, e na qualidade de seu DNA. Estes são alguns pontos relevantes em relação ao tema proposto, que se justifica a abordagem pela contribuição científica e social para a ciência agrária, uma vez que a reprodução está entre os fatores que afetam diretamente a produtividade dos rebanhos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estrutura espermática

A espermatogênese é um termo recorrentemente utilizado em análises de estrutura espermática, sendo descrita como um processo cronológico que envolve a multiplicação e a diferenciação das células germinativas do epitélio seminífero dos testículos, que resulta na formação do espermatozoide, o gameta dos machos (MARTINS, 2019) (Figura 1).

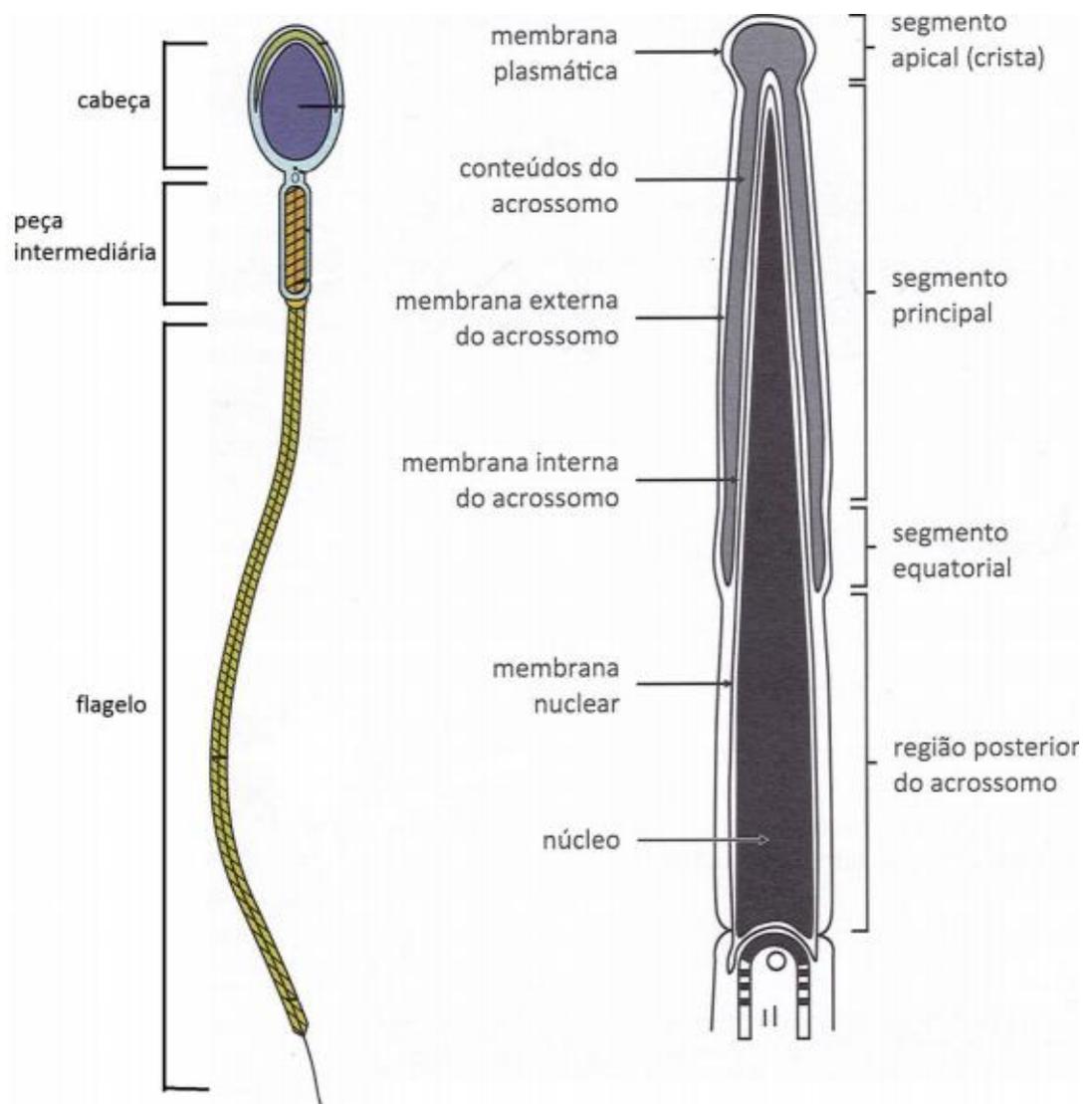


Figura 1. Estrutura do espermatozoide bovino. Fonte [Modificado Andrologia Básica, Henry 2013].

Os espermatozoides são células haploides e alongadas, constituídas de cabeça, cauda ou flagelo e colo, totalmente recobertas pela membrana plasmática. A cabeça contém acrossoma e núcleo achatado de forma oval, com cromatina altamente compactada, a qual tem uma classe especial de proteínas, chamadas de protaminas. Já a cauda do espermatozoide consiste em quatro segmentos: colo (pescoço), peça intermediária, principal e terminal. O colo, que está localizado na região pós-acrossomal, é responsável pela conexão da cabeça com a cauda ou flagelo, ambos envoltos pela mesma membrana plasmática. Na ejaculação, o sêmen liberado é formado pelos espermatozoides maduros, juntamente com as secreções do canal deferente, das vesículas seminais, da próstata e das glândulas bulbouretrais (SANTOS et al., 2018).

As membranas espermáticas exercem inúmeras funções que estão relacionadas ao metabolismo celular e também na manutenção da motilidade, capacitação, reação acromossomal e interações do espermatozoide com o epitélio do trato genital da fêmea e interação com oócito. A sua integridade garante a manutenção da homeostase celular, além de atuar como uma barreira entre o meio externo e interno e, devido à importância deste processo, é preciso analisar os fatores que possam representar estresse e pontos vulneráveis que venham a comprometer a integridade e funcionalidade da membrana plasmática e um deles diz respeito à fase de transição dos lipídios que pode trazer alterações importantes no estado funcional da membrana (BERGSTEIN et al., 2014).

Uma etapa importante da diferenciação nuclear que ocorre durante a espermatogênese é a condensação da cromatina dos espermatozoides, pois ocorre a substituição das histonas somáticas do DNA pelas protaminas (P1), configurando-se em uma estrutura altamente compactada (toróide ou donut), essencial para a proteção e manutenção da estabilidade do DNA (KAYA et al., 2014).

Compreender a estrutura espermática dos bovinos é fundamental para o alcance de uma maior eficiência em relação à reprodução animal, pois ainda que o sêmen de alguns reprodutores apresente valores espermáticos satisfatórios, pode ocorrer baixa taxa de fertilidade do rebanho e isso está diretamente relacionado com os seguintes fatores: aspectos morfométricos, fisiológicos (integridade da membrana plasmática) e bioquímicos (qualidade do DNA do espermatozoide) (RONDA et al., 2019). Em outras palavras, o potencial reprodutivo de um touro está associado à soma de diversos fatores ligados à reprodução, denominado pela literatura como características andrológicas.

Assim, a avaliação espermática e/ou morfologia espermática tem por finalidade promover a análise seminal e consiste, em linhas gerais, em um estudo anatômico do gameta

masculino, ou seja, da célula espermática. No sistema de reprodução dos bovinos, é fundamental que o espermatozoide consiga chegar à tuba uterina, fertilizar o óocito e induzir o desenvolvimento embrionário de forma adequada. Entretanto, todo este processo ocorre em etapas e o sêmen precisa superar vários obstáculos impostos pelo trato reprodutivo feminino, onde espermatozoides normais e com maior nível de perfeição são capazes de atingir e penetrar o óocito, mas serão considerados viáveis somente se o DNA transportado estiver intacto e também sustentar o desenvolvimento embrionário (ARRUDA et al., 2015).

2.2 Avaliação de termorresistência

O teste de termorresistência (TTR) analisa a resistência das células espermáticas ao aquecimento, através da avaliação da porcentagem de espermatozoides móveis na dose inseminante, ou seja, avalia a motilidade e o vigor espermáticos no tempo zero, e em períodos de tempo que variam de 30 a 90, 180 e 240 minutos (BORGES-SILVA et al., 2015).

No estudo de Cunha et al., (2012), os autores fizeram uma análise comparativa da eficiência de três metodologias, o TTR lento (38°C/5h), o TTR fisiológico (36°C/3h) e o TTR rápido (46°C/30 min). As avaliações de motilidade e vigor foram realizadas de modo subjetivo em microscópio de contraste de fase, sendo que as análises indicam que o TTR lento compromete os resultados de motilidade e vigor. Com isso, ficou demonstrada nessa pesquisa que o TTR é uma avaliação complementar que necessariamente precisa servir de parâmetro na análise da qualidade do sêmen, devendo ainda, ser realizada em associação com outros testes de avaliação espermática para determinar a fertilidade de uma amostra de sêmen criopreservado.

No estudo realizado por Vianna (2005), o autor menciona que o TTR lento é uma denominação criada primeiramente por Dimitropoulos (1967), na análise da incubação de amostras de sêmen a uma temperatura de 38° C durante um período de cinco horas, o qual foi possível constatar que a porcentagem de motilidade foi progressiva, apresentando correlação positiva e bastante significativa com a fertilidade real, medida pelo índice de não retorno ao cio aos 60-90 dias.

De acordo com CUNHA et al. (2012), o sêmen bovino depois de submetido ao TTR deve apresentar pelo menos 15% de motilidade espermática progressiva retilínea e escore 3 (escala de 1 a 5) de vigor espermático. Com isso, as avaliações de Termorresistência (TTR) ganharam espaço nas pesquisas científicas por sua relação positiva e alta com a fertilidade a campo, apresentando uma semelhança das condições de permanência do sêmen no trato

genital das fêmeas em cio, simulando o processo biológico. O TTR rápido é mais agressivo devido a alta temperatura que expõe os espermatozoides, porém condena menos amostras que o TTR lento, além de acelerar o processo de análise pós-descongelamento, sendo uma prova realizada em um curto período de tempo a uma temperatura maior que a do organismo animal.

2.3 Avaliação microscópica

Com o conhecimento adquirido sobre o sêmen, sabe-se que a melhor forma de determinar as suas características e fertilidade do bovino é através de uma análise multifatorial acerca da funcionalidade e estrutura espermática, que possa predizer o padrão da qualidade do sêmen bovino, o qual se baseia na proporção de células móveis (motilidade e vigor espermático) e morfologia espermática. Para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas plasmáticas normais (ARRUDA et al., 2011).

Na avaliação rotineira das características morfológicas dos espermatozoides existem duas técnicas principais, quais sejam: esfregaços corados (corantes: Wright, Rosa de Bengala, Giemsa e eosina-nigrosina, Karras e outros) em microscópio de campo claro e a preparação úmida com microscópio de contraste de fase (ARRUDA, et al., 2015). É preciso estar atento à aplicabilidade da avaliação rotineira na avaliação do vigor, motilidade, concentração e morfologia espermática em virtude de algumas limitações na detecção de problemas mais sérios nas células (BRITO, 2012).

No estudo de Simões et al. (2014), os autores demonstraram que a análise seminal de rotina não é efetiva na detecção de danos na cromatina espermática, porém, isso não impede a sua utilização com sucesso na avaliação espermática. Para estudos de pesquisa, esse tipo de análise, do vigor, motilidade, concentração e morfologia espermática, define alguns parâmetros, contudo, há necessidade de outras avaliações para predizer uma melhor condição do espermatozoide. A utilização de análise computadorizada de imagens, métodos de coloração empregando fluorescentes em microscopia ou ainda, a citometria de fluxo são alguns exemplos de técnicas mais modernas que fornecem uma análise mais criteriosa do sêmen (ARRUDA et al., 2015).

2.4 Técnicas de avaliação

Conforme relato da literatura especializada, em razão do maior interesse na produção de bovinos em todo o mundo, abriu-se um caminho para o desenvolvimento de pesquisa no que diz respeito à avaliação do sêmen e, conseqüentemente, a realização de testes laboratoriais de forma a buscar maior eficácia na análise da qualidade e confiabilidade quanto às técnicas de reprodução assistida. Esses testes possibilitam à detecção de danos específicos na célula espermática, o que não ocorre em relação à avaliação convencional.

- *Citometria de fluxo*

A técnica da Citometria de Fluxo, desenvolvida primeiramente em 1934, consiste em uma análise citológica através de equipamentos modernos que tem seu funcionamento através de laser, o que permite maior precisão nos resultados. É utilizada com frequência para analisar alterações espermáticas e também na sexagem espermática por quantificação do DNA (BRITO et al., 2018).

Embora a Citometria de Fluxo não permita uma avaliação concomitante da cromatina e da morfologia do espermatozoide e tenha um custo relativamente elevado, o que limita a sua utilização no país, é preciso chamar a atenção para a necessidade de sua utilização na avaliação espermática, pois para a reprodução de bovinos, os estudos demonstram melhorias em relação ao aumento da produção de gado, seja de corte ou de leite, além de ganhos de rendimento e genéticos, de forma que o custo/benefício deve preponderar na decisão de sua realização (VILLADIEGO et al., 2018).

De acordo com Arruda et al. (2007), com esta técnica, além da análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal, combinada ao uso de fluoróforos, é possível a avaliação do potencial de membrana mitocondrial, integridade do DNA, peroxidação lipídica, capacitação e reação acrossômica, apoptose, entre outros.

Essa técnica é vantajosa sobre as outras clássicas para a avaliação da viabilidade e integridade espermática, pois este sistema automatizado tem a capacidade de examinar milhares de espermatozoides em menos de um minuto, mede a quantidade de uma ou mais sondas fluorescentes associadas às células espermáticas com precisão, sensibilidade, rapidez e em grande quantidade de células. É possível contar e examinar as células em uma solução aquosa, que segue um fluxo linear, onde passam individualmente através de um feixe de luz, que excita os marcadores, ou fluorocromos, associados às células e capta a frequência da luz.

O citômetro de fluxo, por sua vez, converte essa frequência em sinais elétricos, que são quantificados por softwares específicos (BERGSTEIN et al., 2014).

Os marcadores moleculares são sondas fluorescentes usadas na identificação de alterações estruturais ou metabólicas no interior da célula. A leitura das amostras coradas com essas sondas pode ser feita em microscópio de fluorescência ou em citômetro de fluxo (SOUSA et al.,2013).

Com os avanços tecnológicos e a criação de novas metodologias nos últimos 50 anos, foi possível desenvolver uma variedade significativa de marcadores moleculares, por exemplo: marcadores de membrana plasmática (CFDA, 6-carboxifluoresceína; IP, iodeto de propídio), de reação acrossomal (FIT-PSA, isotiocianato de fluoresceína associado à aglutinina do *Pisum sativum*, PNA-Fitc, isotiocianato de fluoresceína associado à aglutinina do *Arachis hypogaea*), potencial mitocondrial (JC-1, iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,10,3,30-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina; R123, rodamina 123), e a escolha de um ou outro está associado com o objetivo do estudo. A utilização de sondas fluorescentes permite mensurar a viabilidade espermática, com a avaliação estrutural e funcional dos espermatozoides de forma mais ampla, criteriosa e rápida (BERGSTEIN et al., 2014).

O iodeto de propídio (PI) atravessa a membrana plasmática lesada, se liga especificamente ao DNA, corando o núcleo das células em vermelho. Este corante fluorescente se destaca pela facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência, seja isoladamente ou em associação a outras sondas (ARRUDA et al., 2007).

Para avaliar a membrana acrossomal, utiliza-se a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), por possuir especificidade a glicoproteínas na membrana e conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) marca o acrossomo lesado em verde amarelado. Observa-se com a precisão e linearidade da sonda FITC-PSA, um aumento da porcentagem dos espermatozoides marcados com PSA, coincidente com o aumento da porcentagem de espermatozoides com acrossomo danificado (CELEGHINI et al., 2007).

- Avaliação da integridade do DNA

Indiscutivelmente, a integridade do DNA de espermatozoides é também um dos aspectos que chama a atenção dos estudos de reprodução animal, uma vez que em mamíferos, como é o caso dos bovinos, tem uma importância crucial para a contribuição paterna de um descendente normal. Com efeitos, qualquer dano no DNA pode ocasionar sérios problemas, como a morte celular e a indução de mutações nas gerações futuras, ou ainda, em problemas

de fertilidade do macho. Não por acaso, a sua avaliação tornou-se um indicador relevante na determinação da saúde do espermatozoide (CARREIRA, 2008).

Um dos acontecimentos recorrentes em relação ao DNA diz respeito à possibilidade de sua fragmentação, por esse motivo a análise de sua integridade é importante e deve ser feita em associação com os outros parâmetros, ou seja, integridade da membrana plasmática e acrossomal, que fornece subsídios para uma melhor análise da fertilidade espermática. Assim, nos últimos anos ocorreu um esforço no sentido de desenvolver técnicas para mensurar a integridade do DNA e uma delas é o método do túnel, considerado viável para detectar com maior precisão os danos do DNA, inclusive é recomendável a utilização desta técnica na análise de rotina (MARTINS et al., 2008).

A análise da estrutura da cromatina espermática (Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA) é considerado padrão ouro na avaliação da susceptibilidade do DNA à desnaturação. Técnica baseada no exame da fluorescência de células espermáticas coradas com alaranjado de acridina (AA) que, quando submetidos ao citômetro de fluxo são quantificados com fluorescência verde (espermatozoides com cromatina normal) e vermelha (espermatozoides com cromatina alterada) (EVENSON et al., 1980). Contudo, essa técnica não permite a análise morfológica e morfométrica concomitantes do espermatozoide, uma vez que a cromatina é avaliada por citômetro de fluxo e a morfologia é avaliada em esfregaço de sêmen (HIRAIWA, 2015).

Existem ainda outras técnicas utilizadas para identificação de alterações na cromatina em esfregaços de espermatozoides, como a coloração por alaranjado de acridina (AA) sem o uso do citômetro de fluxo (TEJADA et al.; 1984), coloração com azul de toluidina (AT) (MELLO, 1982; BELETTI; MELLO, 1996), coloração com azul de anilina (HAMMADEH et al.; 2001, ERENPREISS et al.; 2001), técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay) (MARTINS et al., 2007), teste de dispersão de cromatina espermática e Esperma-Sus-Halomax (ALKMIN et al., 2013).

Mello (1982) desenvolveu a técnica da coloração por Azul de Toluidina (AT), metacromasia induzida, um corante catiônico, de pH 4,0, que leva à alteração de coloração pela ressonância de elétrons entre suas moléculas. Beletti et al. (2005) explicam em seu estudo que o método de coloração por AT, possibilita a ligação entre as moléculas do corante utilizado (pH 4,0) aos grupos fosfatos ionizados do DNA e vem se revelando como um importantíssimo instrumento de avaliação de alterações na cromatina espermática.

A vantagem deste método é que o pH 4,0 garante que outros sítios (ânios) não sejam ionizados e o AT se ligue de forma não específica no DNA. Assim, os espermatozoides

normais são corados de verde e os que apresentam qualquer tipo de anomalia são corados de violeta. Esse processo guarda relação com o fato de que espermatozoides com cromatina normal, os grupos fosfatos, em sua maioria são bloqueados por protaminas de modo que poucas moléculas se ligam ao DNA, o que resulta em uma coloração verde ou azul claro. Já em relação às células com cromatina pouco compacta ocorre uma maior ligação com as moléculas do corante, produzindo uma coloração de azul escuro a magenta (BELETTI, 2013). Quanto maior for a descompactação da cromatina, maior será a quantidade de ligações a grupos fosfato e mais intensa será a coloração encontrada (OLIVEIRA, 2019).

De acordo com Hiraiwa (2015), desde quando foi desenvolvido o método AT, surgiram vários estudos com a finalidade de demonstrar a sua capacidade de detecção de alterações na cromatina, inclusive análises comparativas de técnicas cujos resultados mostram de fato a sua viabilidade nesse sentido. Mas a autora faz uma observação que diz respeito à subjetividade que pode ocorrer na interpretação dos resultados do estudo em métodos que necessitam de análise visual do pesquisador ao microscópio.

Diante disso, Beletti et al. (2005), na tentativa de diminuir a subjetividade da técnica, desenvolveram um *software* para análise dos esfregaços, onde a imagem computacional avalia diferenças na coloração pelos valores dos pixels de cada imagem e assim, a análise da intensidade da coloração pode ser realizada de forma mais objetiva.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar os efeitos da termorresistência rápida sob os aspectos morfofuncionais das membranas e qualidade da cromatina de espermatozoides pós descongelados de touros.

3.2 - Objetivos específicos

3.2.1 Analisar por citometria de fluxo a integridade da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides pós-descongelados de touros, antes e após o teste de termorresistência.

3.2.2 Analisar a descompactação da cromatina dos espermatozoides, pela técnica do azul de Toluidina, dos espermatozoides pós-descongelados de touros, antes e após o teste de termorresistência.

4. FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS

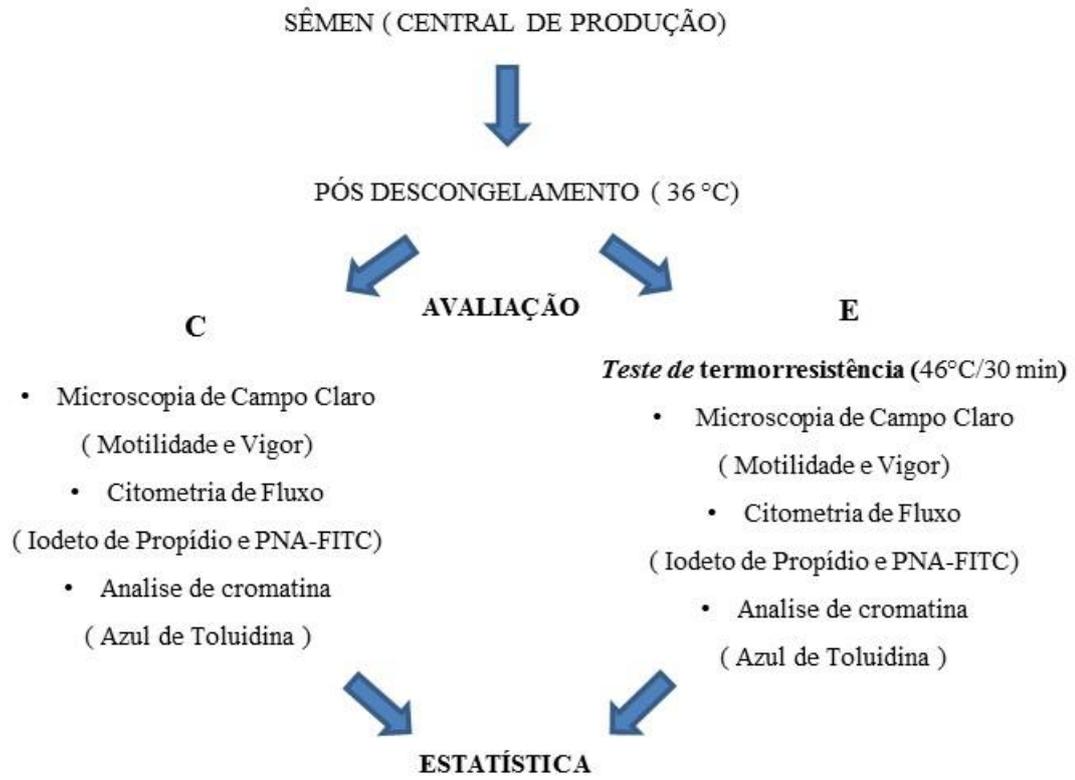


Figura 2. Fluxograma do protocolo Experimental: obtenção do sêmen (descongelamento, 36⁰C por no mínimo 30 segundos); Grupo Controle (C); Grupo Experimental (E). Análise por microscopia de campo claro (10x); Análise por citometria de fluxo; Azul de toluidina (avaliação da cromatina)

REFERÊNCIAS

- ALKMIN, D.V.; MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. **The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax**. *Theriogenology*, v.79, n.9, p.1294-300, 2013.
- ALVES, MBR.; OLIVEIRA, ML.; LANÇONI, R.; FLOREZ-RODRIGUES, SA.; CELEGHINI, ECC.; ARRUDA, RP.; ANDRADE, AFC. **Investigando a compactação e a fragmentação não induzida do DNA espermático: refinamento da avaliação espermática – parte 1**. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.39, n.2, p.263-269, abr./jun. 2015.
- ARRUDA, RP.; ANDRADE, AFC.; PERES, KR.; RAPHAEL, CF.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, ECC. **Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino**. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.8-16, jan./mar. 2007.
- ARRUDA, RP.; CELEGHINI, ECC.; ALONSO, HF. et al. **Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros**. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151, abr./jun. 2011.
- ARRUDA, RP.; CELEGHINI, ECC.; GARCIA, AR. et al. **Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos**. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.47-60, jan./mar. 2015.
- AURÉLIO NETO, O. **O Brasil no mercado mundial de carne bovina: análise da competitividade da produção e da logística de exportação brasileira**. *Ateliê Geográfico, Goiânia-GO*, v. 12, n. 2, p. 183-204, 2018.
- BELETTI, ME. **Cromatina espermática: quebrando paradigmas**. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 37, p. 92-96, 2013.
- BELETTI, ME.; COSTA, LF.; GUARDIEIRO, MM. **Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa**. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, v.22, n.2, p.85-90, 2005.
- BELETTI, M. E.; MELLO, M.L.S. **Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa**. *Brazilian Journal of Genetics*. v. 19, n.1, p.97-103, 1996.
- BERGSTEIN, TG.; WEISS, RR.; BICUDO, SD. **Técnicas de análise de sêmen**. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.38, n.4, p.189-194, out./dez. 2014.
- BORGES-SILVA, JC.; SILVA, MR.; MARINHO, DB.; NOGUEIRA, E.; SAMPAIO, DC.; OLIVEIRA, LOF.; ABREU, UGP.; MOURÃO, GB.; SARTORI, R. **Cooled semen for fixed-**

time artificial insemination in beef cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, v.28, n.7, p.1004-1008, 2015.

BRITO LF. **NAAB/CSS semen quality control program.** *Proc Tech Conf Artif Insem and Reprod.* 2012.

BRITO, BF.; SANTOS, BMB.; MAIA, LCM.; NATTA, MFR., NUNES, JF.; SALGUEIRO, CCM. **Nova biotécnica de imunosexagem de espermatozoides de ruminantes.** *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.42, n.3-4, p.90-95, jul./dez. 2018.

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

CARVALHO, JO.; SARTORI, R.; LEMES, AP.; MOURÃO, GB.; DODE, MAN. **Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo.** *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília-DF, v.44, n.10, p.1346-1351, out. 2009.

CELEGHINI, ECC.; ARRUDA, RP.; RODRIGUEZ, SAF. et al. **Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos.** *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.40-45, jan./mar. 2017.

CELEGHINI, ECC.; ARRUDA, RP.; ANDRADE, AFC.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, CF. **Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrossomal and Mitochondrial Membranes.** *Reproduction in Domestic Animals*. v.42, p.479-488, 2007.

COUTINHO, LH.; ROSÁRIO, MF.; JORGE, EF. **Biotecnologia animal.** *Estudos Avançados*, v.14, nº 70, São Paulo, 2010.

CUNHA ER., SILVA CG., MARTINS CF. **Estudo comparativo dos testes de termo-resistência rápido, lento e fisiológico em sêmen criopreservado bovino importado.** Sociedade Brasileira de Zootecnia. Brasília, DF, 2012.

EMBRAPA. **Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira.** Nota técnica. Editores: Rodrigo da Costa Gomes. Gelson Luiz Dias Feijó. Lucimara Chiari. 2017.

ERENPREISS, J.; BARS, J.; LIPATNIKOVA, V.; EREMPREISA, J.; ZALKALNS, J. **Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity.** *Asian Journal of Andrology*, v.22, n.1, p.45-53, 2001.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. **Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility.** *Science*, v.210, n.4474, p.1131-1133, 1980.

GOMES, RC.; FEIJÓ, GLH.; CHIARÁ, L. **Evolução e qualidade da pecuária brasileira.** Campo Grande: Embrapa, p. 1-4, 2017.

HAMMADEH, ME.; ZEGINIADOV, T.; ROSENBAUM, P.; GEORG, T.; SCHMIDT, W.; STREHLER, E. **Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility.** Archives of Andrology, v.46, n.2, p.99-104, 2001.

HENRY, M.; ECHEVERRI, AML. **Andrologia veterinária básica.** Belo Horizonte: CAED-UFMG, 2013.

HIRAIWA, SH. **Classificação das alterações cromatínicas de espermatozoides bovinos e sua correlação com a eficiência na produção in vitro de embriões.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

KAYA, A.; BIRLER, S.; ENWALL, L.; MEMILI, E. **Determinants of sperm morphology.** In: Chenoweth, PJ.; Lorton, SP. (Ed.). Animal Andrology: Theories and Applications. UK: CAB International, 2014. cap 3, p. 34-47.

Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal / Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 3ª ed., - Belo Horizonte: CBRA 2013. Disponível em: <www.cbra.org.br> Acesso em 12 set. 2020.

MARTINS, AAB. **Avaliação da compactação da cromatina espermática durante o trânsito do espermatozoide através do epidídimo de camundongos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, 2019.

MARTINS, CF.; DODE, MN.; BAO, SN.; RUMPF, R. **The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA.** Genetics and Molecular Research, v.15, p.94-104, 2007.

MARTINS, CF., DODE, MN.; BÃO, SN.; RUMPF, R. **Método do túnel:** uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatozoides bovinos. Planaltina, Distrito Federal, Embrapa Cerrados, 2008.

MELLO, MLS. **Induced metachromasia in bull spermatozoa.** Histochemistry, v.74, n.3, p.387-392, 1982.

NASCIMENTO, PS.; CHAVES, MS.; SANTOS FILHO, AS. et al. **Produção in vitro de embriões utilizando-se sêmen sexado de touros 5/8 Girolando.** Ciência Animal Brasileira. v.16, n.3, p.358-368, 2015.

NEVES, JP.; MIRANDA, KL.; TORTORELLA, RD. **Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI.** Rev. Bras. Zootec., v.39, p.414-421, 2010.

OLIVEIRA, PRH. **Características de condensação da cromatina e morfometria espermática de touros da raça GIR**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Reprodução Animal. Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias. Jaboticabal, São Paulo, 2019.

REGITANO, LAC.; VENERONI, GB. **Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal**. Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal – 22 e 23 de junho de 2009. Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP – Brasil.

RONDA, JB.; RIBEIRO, GL.; JACOMINI, JO.; QUINTAL, APN.; VASCONCELOS, AB. **Classificação andrológica por pontos e características andrológicas na avaliação reprodutiva de touros da raça gir candidatos ao teste de progênie**. *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, v.20, 1-8, e-44670, 2019.

ROSA, NA.; MARTINS, EN.; MENEZES, GRO.; SILVA, LOC. **Melhoramento genético aplicado em gado de corte: Programa Geneplus**. Embrapa. Brasília, DF, 2013.

SANTOS, JFD.; SANTOS, KJG.; SANTOS, APP.; BACHES, C; FERRO, RAC.; PEIXER, PF. **Qualidade do sêmen bovino criopreservado**. *Espacios*, v.39, nº 14, p. 01-15, 2018.

SIMÕES, R.; SIQUEIRA, AFP.; NICHI, M.; VISINTIN, JA.; ASSUNPÇÃO, MEOD. **Qualidade da cromatina espermática e sua implicação no desenvolvimento embrionário inicial de bovinos**. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*. v. 12, n. 3 (2014), p. 18 – 35, 2014.

SIQUEIRA, JB.; GUIMARÃES, JD.; COSTA, EP. et al. **Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro***. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Botucatu, v.36, n.2, p.387-395, 2007.

SOUSA, DB.; BICUDO, SD.; AZEVEDO, HC.; MAIA, MS. **Ranqueamento/agrupamento do sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês analisados pelo sistema CASA e sondas fluorescentes pela análise estatística multivariada**. *Vet Zootec*, v.20, p.649-657, 2013.

TANNO, P. **Estudo das alterações morfofuncionais de espermatozoides bovinos submetidos a sexagem por meio da técnica da citometria de fluxo**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TEJADA, RI.; MITCHELL, JC.; NORMAN, A.; MARIK, JJ.; FRIEDMAN, S. **A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence**. *Fertility and Sterility*. v.42, n.1, p.87-91, 1984.

VALLE, ER.; ANDREOTTI, R.; THIAGO, LRL. **Estratégias para aumento da eficiência reprodutiva e produtiva em bovinos de corte.** Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1998. 80p.

VASCONCELOS, AB.; ZANDONAIDE, JBZ.; SOBRINHO, ALF.; SILVA, BO.; QUINTAL, PNQ. **A comparative study of three different dyes evaluating the physical integrity of the plasma membrane of cryopreserved bovine spermatozoa.** Vet. Not. Uberlândia, MG, v.23, n.1, p.13-22, jan./abr. 2017, ISSN 1983-0777.

VIANNA, FP. **Eficiência dos testes de termoresistência (lento e rápido) em relação a fertilidade de sêmen congelado na espécie bovina.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista – Unesp. Botucatu, São Paulo, 2005.

VILLADIEGO, FAC.; GUIMARÃES, JD.; COSTA, EP.; ALVÁRES, JA.; LEÓN, VHG.; LOPES, CJR. **Sêmen sexado através de citometria de fluxo e centrifugação por gradiente de concentração.** Rev. Med. Vet. ISSN 0122-9354 ISSN 2389-8526: Bogotá (Colombia) N° 36: 121-133, enero-junio del 2018.

CAPÍTULO II

Alterações das características de membrana e da cromatina de espermatozoides pós-descongelados de bovinos, após teste de termorresistência.

Changes in the characteristics of the membrane and chromatin of sperm post thawed cattle, after thermoresistance test.

Resumo

A análise do sêmen e a fertilidade dos touros no desempenho reprodutivo do rebanho tem uma relevância significativa para a bovinocultura, pois a baixa fertilidade tem impacto direto na produtividade do sistema e o país vem obtendo excelentes resultados na comercialização de sêmen bovino criopreservado. Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da termorresistência rápida sob os aspectos morfofuncionais das membranas, por citometria de fluxo, e qualidade da cromatina de espermatozoides, técnica do Azul de Toluidina, antes e após o teste de termorresistência. Foram utilizadas seis partidas de sêmen congeladas de dez touros. Para análise estatística foi utilizado o teste T pareado, significância ($P < 0.05$). Observou-se que dos resultados apresentados, as amostras de sêmen depois do teste de termorresistência apresentaram uma redução de aproximadamente 56% para a motilidade e 36% para o vigor ($P < 0.05$), quando comparado as amostras antes do teste. Na avaliação por citometria de fluxo observou-se diferença significativa para todos os pontos analisados (membrana plasmática e membrana acrossomal). Da análise da compactação e da heterogeneidade foi realizada a média de todos os espermatozoides, pré e pós-teste de termorresistência sem significância estatística. Concluiu-se que o teste de termorresistência rápido (TTR) altera as estruturas, principalmente acrossomal e não tem interferência na estrutura da compactação da cromatina, devendo ser considerado, em associação com outros testes de avaliação, um parâmetro complementar na avaliação da qualidade do sêmen bovino.

Palavras-chave: fertilidade, células espermáticas, termorresistência, membranas.

Abstract

The analysis of the semen and the fertility of the bulls in the reproductive performance of the herd has a significant relevance for the bovine culture, since the low fertility has a direct impact on the productivity of the system and the country has been obtaining excellent results in the commercialization of cryopreserved bovine semen. This work aims to evaluate the effects of rapid thermoresistance under the morphofunctional aspects of membranes, by flow cytometry, and quality of sperm chromatin, Toluidine Blue technique, before and after the thermoresistance test. Six sets of frozen semen from ten bulls were used. For statistical analysis, the paired T test, significance ($P < 0.05$), was used. It was observed that from the results presented, semen samples after the resistance test showed a reduction of approximately 56% for motility and 36% for vigor ($P < 0.05$), when compared to samples before the test. In the evaluation by flow cytometry, a significant difference was observed for all points analyzed (plasma membrane and acrosomal membrane). From the analysis of compression

and heterogeneity, the average of all sperm was performed, pre- and post-thermorestistance test without statistical significance. It was concluded that the rapid thermoresistance test (TTR) alters the structures, mainly acrosomal and has no interference in the chromatin compression structure, and should be considered, in association with other evaluation tests, a complementary parameter in the evaluation of bovine semen quality.

Keywords: fertility, sperm cells, thermoresistance, membranes.

INTRODUÇÃO

O agronegócio no Brasil é responsável pela geração de um terço do Produto Interno Bruto (PIB) e dentre os segmentos que o compõem, a pecuária de corte é uma das mais importantes na geração de emprego e renda para o país, ocupando um lugar de destaque nas exportações brasileiras (GOMES et al., 2017). Outro fator importante é a inseminação artificial com amostras de animais geneticamente superiores que vem ganhando destaque, tanto assim que o país vem obtendo excelentes resultados na comercialização de sêmen bovino criopreservado. Por esse motivo, a preocupação com a fertilidade dos bovinos é recorrente dos produtores rurais, bem como de estudiosos que se dedicam a análise espermática dos animais, a fim de detectar alterações nos espermatozoides (ROSA et al., 2013).

De acordo com Arruda et al. (2011), a melhor forma de determinar as características e fertilidade do rebanho, é através de uma análise multifatorial acerca da funcionalidade e estrutura espermática, que possa prever o padrão da qualidade do sêmen bovino, o qual se baseia na proporção de células móveis (motilidade e vigor espermático) e morfologia espermática.

O potencial de fertilidade dos machos é determinado pela análise do sêmen bovino, através de um conjunto de avaliações, entretanto, para que essa análise seja mais eficiente, faz-se necessário também, avaliar a estrutura interna das células espermáticas em conjunto com o teste da termorresistência, no sentido de conhecer e analisar o comportamento, a capacidade de resistência e o resultado final dos espermatozoides *in vitro*, para averiguar informações relevantes sobre a fecundação, desenvolvimento embrionário e, ainda, as características genéticas paternas (ALVES et al., 2015).

Dentre os testes existentes, podemos citar os de termorresistência rápido (TTR), que são utilizados na avaliação da fertilidade do sêmen congelado, pois a permanência do sêmen

em banho-maria se aproximaria das condições em que o mesmo fica exposto no trato genital das fêmeas, simulando o processo biológico (CUNHA et al., 2012).

O TTR, em conjunto com a citometria de fluxo, combinada ao uso de fluoróforos, possibilita a avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, bem como da integridade do DNA, fornecendo parâmetros pré e pós aquecimento do sêmen pós-descongelados de touros (ARRUDA et al., 2007). Acrescentando também à análise, a técnica do Azul de Toluidina (AT), relatada por Mello em 1982, a qual vem sendo largamente empregada no estudo das alterações cromatínicas, considerada mais simples, de menor custo e altamente sensível, este método possibilita não apenas determinar alterações da cromatina, como também da morfologia da cabeça dos espermatozoides (BELETTI et al., 2005).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da termorresistência rápida sob os aspectos morfofuncionais das membranas (plasmática e acrossomal) e qualidade da cromatina, através da citometria de fluxo e coloração do Azul de Toluidina, de espermatozoides pós descongelados de touros, pré e pós teste de termorresistência rápido.

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção das amostras de sêmen bovino

Foram utilizadas seis partidas de sêmen congeladas de dez touros, obtidas junto a Sexing Technologies Repro I.C.M.G.A. Ltda. (Bonificação e Brindes) Protocolo de Autorização de Uso 135190833813983 08/11/2019 – CNPJ 23.694.902/0001-70 – Indaiatuba – SP.

Preparação Espermática

Para o experimento as amostras foram descongeladas, em banho-maria à 36°C. Foram separadas, em duas alíquotas, conforme os grupos. A primeira alíquota, grupo controle (C) foi mantida em tubo de ensaio previamente aquecido a 36°C em média 5 minutos e posteriormente foram feitas as avaliações por microscopia, citometria e análise de cromatina. A segunda alíquota, grupo experimental (E) foi mantida em banho-maria pré-aquecida a 46°C por 30 min, seguida das avaliações supracitadas.

Avaliações espermáticas

Das avaliações por microscopia foi utilizado microscópio de campo claro modelo Nikon eclipse e200, para tal foi adicionada entre lâmina e lamínula um volume de 10 μ L da amostra, antes e após o teste de termorresistência, e avaliada em aumento de 10x (motilidade espermática e vigor), conforme o manual do colégio brasileiro de reprodução (2013).

As avaliações por citometria foram realizadas no equipamento FACSCalibur™ com possibilidade de detecção dos parâmetros de integridade de membrana plasmática e acrossomal, uma vez que o equipamento tem a complexidade de até três fluorescências distintas.

As amostras pós descongelamento foram avaliadas antes e após o teste de termorresistência. Assim as amostras foram coradas com PNA-Fitc (1,125 g/mL) e incubadas por 10 minutos em banho-maria a 37°C. Em seguida adicionou-se IP (1,5 mM) e foram incubadas por mais 10 minutos a temperatura ambiente, conforme descrito por Vasconcelos e colaboradores (2017).

O critério de análise dos dados correspondentes à fluorescência vermelha, IP (FL3 fotodetector), e verde, PNA-Fitc (FL1 Fotodetector), das partículas foram contabilizados. Os espermatozoides que fluoresceram em vermelho foram classificados com membrana plasmática não íntegra e os que fluoresceram em verde apresentavam membrana acrossomal externa não intacta. A análise de interpretação dos dados pelo programa Cell Quest está representada na Figura 1.

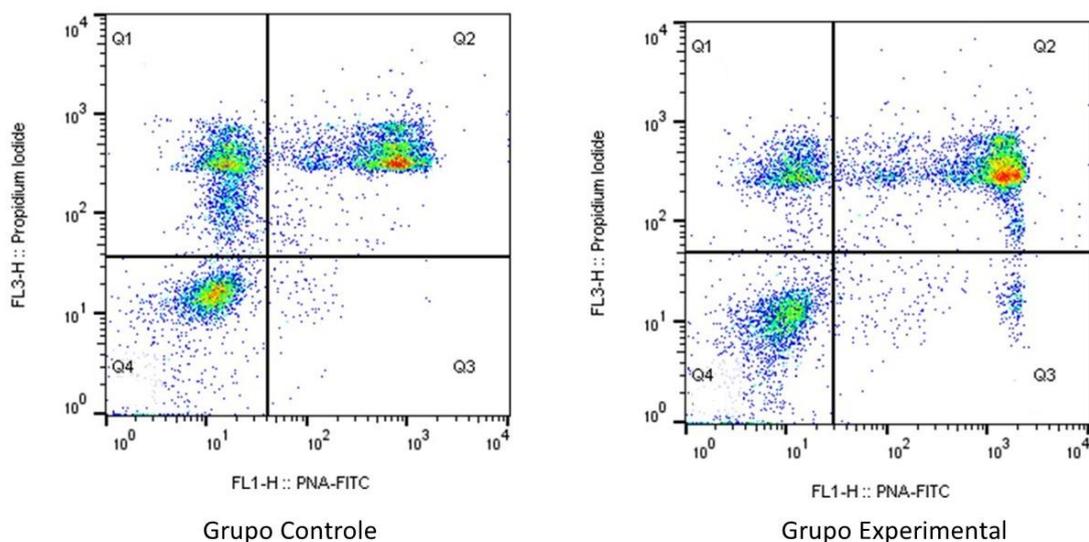


Figura 1. Representação gráfica de distribuição pontual da marcação do espermatozoide bovino, pós-descongelamento, dos grupos Controle e Experimental, marcados com: Q1 - Iodeto de propídio (IP); Q2 - marcação dupla Iodeto de propídio (IP) e PNA - Fitc; Q3 - PNA-Fitc; Q4 sem marcação (espermatozoides viáveis).

Para análise da cromatina foi seguido o protocolo conforme relatado por Beletti e colaboradores (2005). As análises por coloração de azul de toluidina foram realizadas no Laboratório de Biologia da Reprodução do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Para tal, foi realizada a técnica de esfregação das amostras submetidas aos dois momentos (antes e pós-teste de termorresistência), assim foram fixados com álcool absoluto: ácido acético: 3:1, com por um minuto e posteriormente imersos em álcool 70% por três minutos.

Foram confeccionadas quatro lâminas de cada amostra, posteriormente, as lâminas foram mantidas em ácido clorídrico 4N por 25 minutos, seguido de lavagem em água destilada, a lâmina foi mantida em temperatura ambiente (secar) seguida da adição de três a quatro gotas de azul de Toluidina sobre a lâmina e coberta com lamínula.

Para a análise foi utilizado um microscópio (Leica DM500) acoplado a um sistema de captura de imagens (Leica ICC50), com objetiva de 100x com óleo de imersão, em microscópio óptico acoplado a câmera, onde foram obtidas de 30 a 50 imagens de cada lâmina preparada.

As imagens obtidas apresentavam coloração em azul-claro quando apresentam condensação normal da cromatina, e da variação de azul-claro para azul-escuro aponta cromatina moderadamente descondensada; e de azul-escuro até violeta, as cromatinas altamente descondensadas. Diante disto, para evitar a subjetividade da avaliação das alterações da cromatina, utilizou-se uma rotina de segmentação das cabeças dos espermatozoides desenvolvida em MATLAB e executada no software Octave. Para tal o sistema faz a leitura dos espermatozoides, conforme a tonalidade presente (azul claro até magenta) possibilitando definir o índice de compactação da cromatina (BELETTI et al., 2005).

Utilizando-se uma rotina de segmentação das cabeças dos espermatozoides desenvolvida em MATLAB e executada no software Octave, primeiramente as imagens digitais foram segmentadas por limiarização (*thresholding*), onde foi obtida uma imagem chamada de máscara. A máscara é uma imagem binária (i.e., uma imagem que possui apenas dois tons de cores, no caso o preto e o branco) que, quando combinada com a imagem original, cria uma imagem somente com as cabeças dos espermatozoides, eliminando da imagem original o fundo da imagem (*background*), a cauda e outros elementos corados. Dessa

forma, essa máscara permite separar automaticamente cada cabeça de espermatozoide contido nas imagens originalmente capturadas no microscópio.

Para avaliação da descompactação (Des) e heterogeneidade (Het) cromatínica, utilizou-se um algoritmo desenvolvido em ambiente de programação matemática Scilab, inicialmente as imagens das cabeças espermáticas foram transformadas em tons de cinza (figura 5). Resumidamente o software avalia todas as cabeças de espermatozoide selecionando automaticamente as 10 cabeças mais compactadas (mais claras) e homogêneas. A média dos valores de *pixel* destas cabeças foi considerada como o valor de referência da coloração normal dos espermatozoides (cabeças-padrão). Depois, para cada imagem, a diferença entre o valor médio das cabeças-padrão e o valor médio de cada cabeça analisada foi determinada. Esta diferença foi transformada em porcentagem do valor médio das cabeças padronizadas, caracterizando quantitativamente a intensidade da descompactação desta cabeça (Des). O coeficiente de variação dos níveis de cinza de cada cabeça também foi calculado, caracterizando quantitativamente a heterogeneidade da cromatina desta cabeça (Het), ou seja, a variação da intensidade da descompactação na cabeça do espermatozoide (BELETTI et al., 2005).

Estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa Graphpad prism 6.0 (Graphpad software Inc., San Diego, USA). Os dados foram expressos em média e desvio padrão (três repetições). A comparação de dados entre grupos antes e pós teste de termorresistência foi o teste T pareado, significância ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Observa-se que dos resultados apresentados, as amostras de sêmen antes do teste de termorresistência apresentaram valores médios de 37,5% de motilidade e vigor 2,5, valores estes dentro do estabelecido pelo colégio brasileiro de reprodução (2013), com referência de 30% e vigor 3.

Após o teste de termorresistência, nota-se uma queda na motilidade e no vigor, com a média de 16,5% e 1,6, respectivamente, uma redução de aproximadamente 56% para a motilidade e 36% para o vigor. Com uma diferença significativa ($P < 0,05$), entre os tratamentos observados (Figura 2).

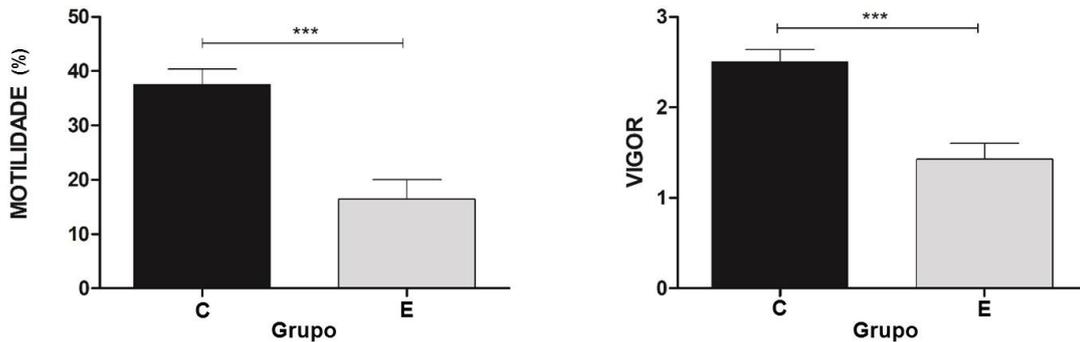


Figura 2. Resultado da média e desvio padrão da motilidade total e vigor das amostras de espermatozoides bovinos, pós-descongelamento (36⁰C) Grupo Controle (C) e após o teste de termorresistência (46⁰C/30min), Grupo Experimental (E) Significância estatística (P < 0,05).

Na análise dos dados por citometria de fluxo, observou-se diferença (P < 0,05), para todos os pontos analisados (membrana plasmática e membrana acrossomal) (Figura 3).

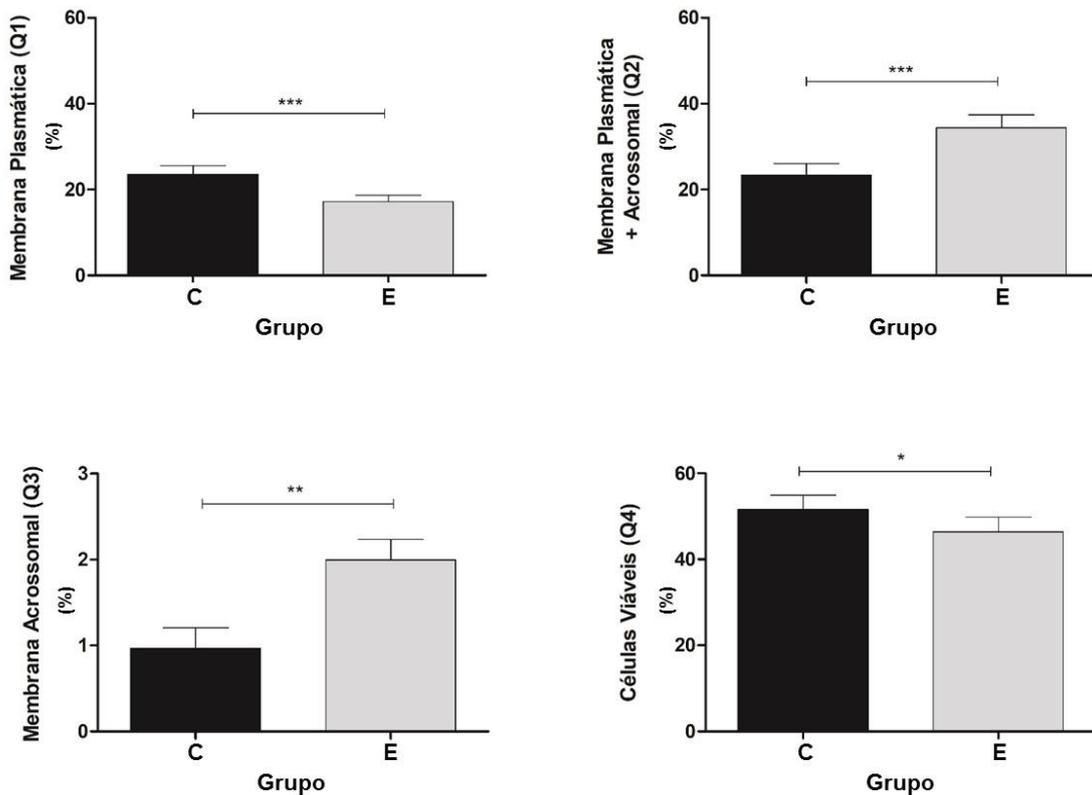


Figura 3. Análise experimental dos testes de citometria de fluxo dos Grupos Controle (C) e experimental (E). Q1 (IP positivo) porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática reativa; Q2 (IP positivo/PNA positivo) porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal reativas; Q3 (PNA positivo) porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras; Q4 (IP negativo/PNA negativo) porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal reativa. Significância estatística (P < 0,05).

Observou-se que antes do teste de termorresistência, os espermatozoides estavam menos reativos às marcações. Por conta desta condição, os valores pré-teste de termorresistência foram maiores do que pós-teste para a membrana plasmática (IP - Positivo) (Q1 - 23,6% e 17,2%), e número de células viáveis (Q4 - 53,6% e 46,4%) (IP -Negativo / PNA - Negativo).

Para a avaliação da marcação dupla Q2 antes (21,4%) e pós teste (34,4%), foram observados valores maiores para o grupo experimental (IP - Positivo / PNA - Positivo). Resultado também observado para as avaliações do grupo Q3 (1,4% e 2%) para o critério (PNA - Positivo).

Da análise da descompactação e da heterogeneidade foi realizada a média de todos os espermatozoides, pré e pós-teste de termorresistência. Conforme a Figura 4, observou-se que não há diferença ($P > 0,05$), quanto aos dois pontos avaliados.

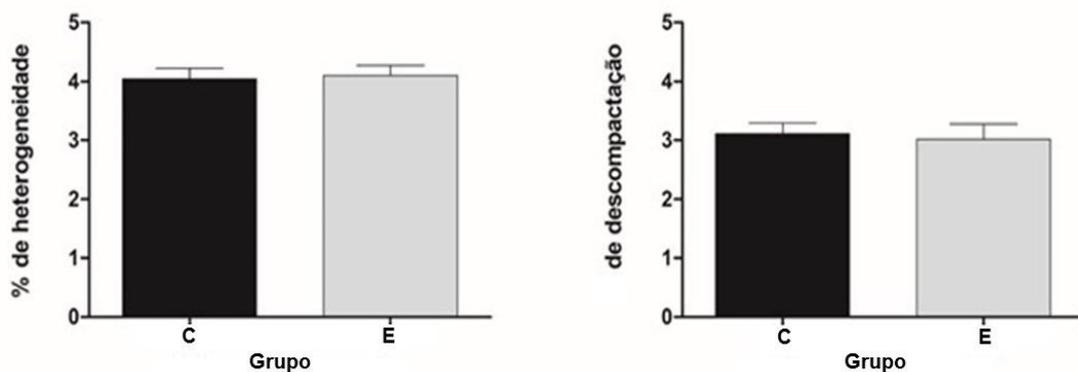


Figura 4. Análise experimental da heterogeneidade e descompactação da cromatina dos Grupos Controle (C) e Experimental (E). Sem diferença estatística ($P > 0,05$).

DISCUSSÃO

Durante a fertilização, a capacitação espermática, reação acrossômica e fusão com o óvulo, são eventos que requerem as membranas plasmática e acrossomal funcionais e intactas. O processo de criogenia causa injúrias nos espermatozoides, diminuindo sua viabilidade espermática. Ciente da extrema necessidade do espermatozoide em manter uma boa viabilidade para se obter uma elevada fertilidade do rebanho, intensificou-se a utilização de técnicas no âmbito da biotecnologia da reprodução, apontadas como ferramentas de suma importância aos programas de melhoramento genético e eficiência na produção dos produtos de origem animal (COUTINHO et al., 2010).

Nos estudos de Celeghini et al. (2017), evidencia-se a importância da aplicação de técnicas adicionais para avaliar partidas de sêmen, antes de serem comercializadas, contribuindo no controle de qualidade do ejaculado, tendo como consequência uma melhor taxa de fertilidade e produtividade do rebanho. No atual estudo, realizou-se a avaliação dos efeitos da termorresistência rápida sob os aspectos morfofuncionais das membranas plasmática e acrossomal por meio da citometria de fluxo, e qualidade da cromatina pela técnica do Azul de Toluidina, de espermatozoides pós descongelados de touros, ambos antes e após o teste de termorresistência, como parâmetro complementar no estudo da qualidade do sêmen.

Dos resultados apresentados, as amostras de sêmen antes do teste de termorresistência apresentaram valores com maior significância em relação aos observados após o teste termorresistência rápido (TTR), possivelmente pela ação da alta temperatura a qual as células foram mantidas. Com isso, minimizando a viabilidade espermática com alteração nas estruturas de membrana, principalmente acrossomal.

Este aspecto foi observado na análise pela técnica de citometria de fluxo, uma vez que os espermatozoides estavam mais reativos às marcações de membrana plasmática e acrossomal, após o teste de termorresistência.

A hipótese para tal resultado é estabelecida uma vez que com o aumento da temperatura, promova uma alteração estrutural dos componentes bioquímicos de membrana, além de promover um aumento da taxa metabólica do espermatozoide. Sabe-se que a membrana é flexível, composta por lipídios e proteínas, com características autosselantes, com canais iônicos definidos por proteínas transmembranas, que atuam seletivamente a solutos, por meio de transportes ativos e passivos (FLESH e GADELLA, 2000). Assim, o aumento da temperatura pode de certa forma atuar nos canais iônicos dependentes de ATP, como a bomba sódio/potássio ATPase e canais iônicos de Cálcio, promovendo uma instabilidade em ambas as membranas, ou melhor, uma reatividade maior aos marcadores, quadrante Q2 (IP positivo/PNA positivo).

Outro ponto que corrobora com tal pensamento é que no grupo experimental (pós-teste de termorresistência), quadrante Q3 (PNA positivo) há um aumento no número de espermatozoides reativos, o que indica uma possível capacitação espontânea induzida pela temperatura. Sabe-se que a capacitação espermática é um processo fisiológico e que pode ser induzida por fatores diversos, como variação do potencial hidrogênio (FLESH e GADELLA, 2000); variação da concentração iônica intracelular (YANAGIMACHI, 1994), e que podem também estar relacionada com a temperatura utilizada no teste de termorresistência rápido.

Esta temperatura pode alterar a fluidez da membrana plasmática, o que promoveria um aumento do metabolismo e conseqüentemente uma maior motilidade, contudo por um período muito curto pela disponibilidade de nutrientes e oxigênio disponíveis no meio.

Entretanto, de acordo com os resultados obtidos na técnica do Azul de Toluidina, pode-se observar que o TTR não interfere na estrutura da cromatina, não há diferença ($P > 0,05$). Esse resultado provavelmente é devido à estrutura do DNA do espermatozoide de mamíferos que apresentam uma unidade básica de toroide de protamina.

Assim, após a interação destas protaminas à cromatina espermática, torna-se uma estrutura inerte e altamente estável, principalmente pela interação dos resíduos de amina da protamina com os grupos fosfatos das fitas de DNA (HAMILTON et al., 2016), o que poderia promover uma estabilidade maior ao DNA quanto às mudanças de temperaturas.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o teste de termorresistência rápido (TTR) altera as estruturas, principalmente acrossomal e não tem interferência na estrutura da compactação da cromatina, devendo ser considerado, em associação com outros testes de avaliação, um parâmetro complementar na avaliação da qualidade do sêmen bovino.

REFERÊNCIAS

ALKMIN, DV.; MARTINEZ-ALBORCIA, MJ.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, JM.; MARTINEZ, EA.; ROCA, J. **The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax**. Theriogenology, v.79, n.9, p.1294-300, 2013.

ALVES, MBR.; OLIVEIRA, ML.; LANÇONI, R.; FLOREZ-RODRIGUES, SA.; CELEGHINI, ECC.; ARRUDA, RP.; ANDRADE, AFC. **Investigando a compactação e a fragmentação não induzida do DNA espermático: refinamento da avaliação espermática – parte 1**. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.39, n.2, p.263-269, abr./jun. 2015.

ARRUDA, RP.; ANDRADE, AFC.; PERES, KR.; RAPHAEL, CF.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, ECC. **Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino**. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.31, n.1, p.8-16, jan./mar. 2007.

ARRUDA, RP.; CELEGHINI, ECC.; GARCIA AR. et al. **Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos**. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.39, n.1, p.47-60, jan./mar. 2015.

BELETTI, ME.; COSTA, LF.; GUARDIEIRO, MM. **Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa.** Brazillian Journal of Morphological Sciences, v.22, n.2, p.85-90, 2005.

CELEGHINI, ECC.; ARRUDA, RP.; RODRIGUEZ, SAF. et al. **Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos.** Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.41, n.1, p.40-45, jan./mar. 2017.

COUTINHO, LH.; ROSÁRIO, MF.; JORGE, EF. **Biotecnologia animal.** Estudos Avançados, v.14, nº 70, São Paulo, 2010.

CUNHA ER., SILVA CG., MARTINS CF. **Estudo comparativo dos testes de termo-resistência rápido, lento e fisiológico em sêmen criopreservado bovino importado.** Sociedade Brasileira de Zootecnia. Brasília, DF, 2012.

ERENPREISS, J.; BARS, J.; LIPATNIKOVA, V.; EREMPREISA, J.; ZALKALNS, J. **Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity.** Asian Journal of Andrology, v.22, n.1, p.45-53, 2001.

HAMILTON, T.R.S.; CASTRO, L.S.; DELGADO, J.D.; ASSIS, P.M.; SIQUEIRA, A.F.P.S.; MENDES, C.M.; GOISSIS, M.D.; O-BLANCO, T.M.; PEREZ, J.A.C.; NICHI, M.; VISINTIN, J.V.; ASSUMPÇÃO, M.E.O. **Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status.** Reproduction, v. 151, n. 4, p. 379-390, 2016.

FLESH, F.M.; GADELLA, B.M. **Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization.** Biochim Biophys, v.1469, p.197-235, 2000

GOMES, RC.; FEIJÓ, GLH.; CHIARÁ, L. **Evolução e qualidade da pecuária brasileira.** Campo Grande: Embrapa, p. 1-4, 2017.

HAMMADEH, ME.; ZEGINIADOV, T.; ROSENBAUM, P.; GEORG, T.; SCHMIDT, W.; STREHLER, E. **Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility.** Archives of Andrology, v.46, n.2, p.99-104, 2001.

Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal / Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 3ª ed., - Belo Horizonte: CBRA 2013. Disponível em: <www.cbra.org.br> Acesso em 12 set. 2020.

MARTINS, CF.; DODE, MN.; BAO, SN.; RUMPF, R. **The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA.** Genetics and Molecular Research, v.15, p.94-104, 2007.

MARTINS, CF., DODE, MN.; BÃO, SN.; RUMPF, R. **Método do túnel: uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatozoides bovinos.** Planaltina, Distrito Federal, Embrapa Cerrados, 2008.

MELLO, MLS. **Induced metachromasia in bull spermatozoa.** Histochemistry, v.74, n.3, p.387-392, 1982.

ROSA, NA.; MARTINS, EN.; MENEZES, GRO.; SILVA, LOC. **Melhoramento genético aplicado em gado de corte:** Programa Geneplus. Embrapa. Brasília, DF, 2013.

SANTOS, JFD.; SANTOS, KJG.; SANTOS, APP.; BACHES, C; FERRO, RAC.; PEIXER, PF. **Qualidade do sêmen bovino criopreservado.** Espacios, v.39, nº 14, p. 01-15, 2018.

TEJADA, RI.; MITCHELL, JC.; NORMAN, A.; MARIK, JJ.; FRIEDMAN, S. **A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence.** Fertility and Sterility. v.42, n.1, p.87-91, 1984.

VASCONCELOS, AB.; ZANDONAIDE, JBZ.; SOBRINHO, ALF.; SILVA, BO.; QUINTAL, PNQ. **A comparative study of three different dyes evaluating the physical integrity of the plasma membrane of cryopreserved bovine spermatozoa.** Vet. Not. Uberlândia, MG, v.23, n.1, p.13-22, jan./abr. 2017, ISSN 1983-0777.

VILLADIEGO, FAC.; GUIMARÃES, JD.; COSTA, EP.; ALVÁRES, JA.; LEÓN, VHG.; LOPES, CJR. **Sêmen sexado através de citometria de fluxo e centrifugação por gradiente de concentração.** Rev. Med. Vet. ISSN 0122-9354 ISSN 2389-8526: Bogotá (Colombia) N° 36: 121-133, enero-junio del 2018.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neill, J. (Eds). **The physiology of reproduction.** New York: Raven Press, 1994. p.189-317