



Estudo comparativo dos testes de termo-resistência rápido, lento e fisiológico em sêmen criopreservado bovino importado¹

Elisa Ribeiro da Cunha^{2,4}, Carolina Gonzales da Silva^{2,4}, Carlos Frederico Martins^{3,4}

¹ Parte do trabalho do primeiro autor como Bolsista de produção CNPq financiado pelo MAPA/CNPq

² Bolsista Capes, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil. email: ercunha@gmail.com e carolgonzaless@gmail.com

³ Pesquisador da Embrapa Cerrados- Brasília. e-mail: carlos.frederico@cpac.embrapa.br

⁴ Laboratório de Reprodução Animal - Embrapa Cerrados, CTZL, DF, Brasil

Resumo: As avaliações de termo-resistência (TTR) ganharam aceitação por se aproximarem das condições de permanência do sêmen no trato genital das fêmeas em cio. Porém, muitas variáveis tornam o TTR uma avaliação muito subjetiva. Neste sentido, este estudo foi realizado para comparar a eficiência de três metodologias de TTR. Foram usados 24 touros de 3 centrais de inseminação. Foram comparados 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. O TTR lento apresentou resultado médio de motilidade de 29,70 ± 22,95%. Esse resultado foi inferior ao TTR rápido, que apresentou motilidade de 46,45 ± 16,45%, e ao TTR fisiológico que apresentou motilidade de 50,93 ± 14,27%. Esses resultados indicam que o TTR lento compromete os resultados de motilidade e vigor. O TTR deve ser considerado uma avaliação complementar para servir de parâmetro na fiscalização da qualidade do sêmen e deve ser realizado em associação com outros testes de avaliação espermática para predizer a fertilidade de uma amostra de sêmen criopreservado.

Palavras-chave: avaliação complementar do sêmen, fiscalização de germoplasma, inseminação artificial

Comparative study of thermo-resistance tests fast, slow and physiological of imported cryopreserved bovine semen.

Abstract: Tests of thermo-resistance (TRT) were accepted by approaching of the conditions that semen remain in the female genital tract. However, many variables make the TRT a very subjective evaluation. Thus, the objective this study was to compare the efficiency of three methods of TRT. Twenty four bulls from three insemination companies were used. We compared the slow TRT (38°C/5h), the physiological TRT (36°C/3h) and fast TRT (46°C/30min) in two assessments with different volumes of semen. The subjective evaluations of motility and vigor were performed in phase contrast microscopy. The slow TRT showed motility mean of 29,70 ± 22,95%. This result was lower than fast TRT that presented motility of 46.45 ± 16.45% and physiological TRT that presented motility of 50,93 ± 14,27%. These results indicated that slow TRT compromises the parameters of motility.. The TTR should be considered an additional assessment to serve as a parameter in monitoring the quality of semen and should be performed in combination with other semen assessments tests to predict fertility of cryopreserved semen sample.

Keywords: additional semen evaluation, inspection of germplasm, artificial insemination

Introdução

Os testes de termo-resistência (TTR) ganharam aceitação, pois a permanência do sêmen por um tempo determinado em banho-maria se aproximaria das condições em que o sêmen fica exposto no trato genital das fêmeas em cio (Arruda et al, 1992). Na avaliação do TTR, o sêmen bovino é considerado de boa qualidade quando apresentar motilidade $\geq 15\%$ após o teste (CBRA, 1998). No entanto, o TTR é uma avaliação muito subjetiva, pois muitas variáveis influenciam no resultado e na sua interpretação, como por exemplo, o diluidor, o volume da palheta, a concentração por dose, o tempo do TTR, a temperatura, a incubação da amostra na palheta ou fora dela.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar a metodologia de TTR mais eficiente e prática na análise do sêmen bovino importado para servir de parâmetro na fiscalização da qualidade do sêmen.

Material e Métodos



Foram utilizadas amostras de sêmen bovino importado de 24 animais das raças Angus e Holandês, provenientes de 3 centrais de inseminação. As amostras foram descongeladas a 36°C/30s e foram avaliados a motilidade e o vigor inicial. Em seguida foram comparadas 3 metodologias de TTR: a) TTR lento (incubação a 38°C/5h); b) TTR fisiológico (incubação a 36°C/3h) e c) TTR rápido (incubação a 46°C/ 30 min). O volume de uma palheta de 0,25 mL foi dividido igualmente para a realização das 3 metodologias de TTR. As amostras foram incubadas em banho-maria em tubo tipo *ependorf*. Uma amostra de 8 µL foi colocada em lâmina sobre lamínula aquecidas e avaliada em microscópio de contraste de fase (10 e 20x) logo após o descongelamento da palheta e após cada período de incubação para cada teste, as avaliações foram realizadas de forma subjetiva por 2 avaliadores.

Resultados e Discussão

De uma forma geral, todos os testes de TTR mostraram uma diminuição na motilidade em relação as amostras recém descongeladas, que apresentaram a motilidade média de 76% e vigor 3 no tempo zero. De acordo com Harrison e Vickers (1990), esta queda de motilidade pode estar correlacionada com a perda de componentes intracelulares ou lesões estruturais na cauda dos espermatozoides ocorridas durante o TTR.

O TTR fisiológico apresentou resultados médios de motilidade superiores aos demais, mas não diferiu do TTR rápido. O TTR lento obteve resultado médio de motilidade e vigor inferior aos outros testes. Estes resultados indicam que o TTR lento compromete os parâmetros de motilidade e vigor, provavelmente devido ao maior tempo de incubação da amostra (Tabela 1).

Tabela 1- Médias e desvio padrão da motilidade e vigor dos diferentes TTRs

Parâmetros	TTR rápido	TTR fisiológico	TTR lento
Motilidade (%)	46,45 ± 16,45 ^a	50,93 ± 14,27 ^a	29,70 ± 22,95 ^b
Vigor (0-5)	2,60 ± 0,62 ^a	2,68 ± 0,46 ^a	1,35 ± 0,99 ^b

Nas linhas, os valores com letras diferentes (a-b) apresentaram diferença estatística. P<0,05

Em relação ao TTR, este estudo observou que o teste lento prejudicou a motilidade e vigor espermático em relação aos testes fisiológico e rápido. O TTR rápido, apesar de apresentar resultados similares aos do fisiológico, é mais agressivo devido a alta temperatura que expõe os espermatozoides num curto período de tempo a uma temperatura maior que a do organismo animal. O TTR fisiológico é o que mais se aproxima das condições reais que os espermatozoides encontram no trato reprodutor feminino usando uma temperatura e tempo mais próximos do que o espermatozoide vai enfrentar.

Testes comparativos mostraram que o TRR rápido pode substituir o TTR lento, uma vez que este teste condena menos amostras que o TTR lento (Barnabé *et. al.*, 1981).

Porém ainda há muitas dúvidas sobre a real importância do TTR para avaliação do efeito da criopreservação sobre os espermatozoides. Neste estudo, observou-se que quando os resultados foram analisados individualmente por animal, todos os testes apresentaram variações no resultado quando houve variação do volume de sêmen testado (dados não mostrados).

Muitos fatores influenciam nos resultados do TTR como o diluidor usado, o tempo de incubação, o volume da amostra e a concentração de espermatozoides, essas variáveis precisam ser melhor avaliadas para que o TTR possa ser usado como teste de rotina. Vianna *et al.* (2009) apesar de encontrarem baixas motilidades nos TTRs rápido e lento, não observaram relação com a fertilidade a campo demonstrando a necessidade de usar o TTR como um teste complementar.

Por isso é um teste que deve ser considerado complementar para o sêmen bovino congelado. No entanto, avaliações funcionais dos espermatozoides devem ser realizadas para correlacionar a eficiência da metodologia de TTR com a qualidade real da amostra.

Conclusões

O TTR deve ser considerado uma avaliação complementar para servir de parâmetro na fiscalização da qualidade do sêmen e deve ser realizado em associação com outros testes de avaliação espermática para predizer a fertilidade de uma amostra de sêmen criopreservado.



**Anais da 49ª Reunião Anual da
Sociedade Brasileira de Zootecnia
A produção animal no mundo em transformação**

Brasília – DF, 23 a 26 de Julho de 2012



Agradecimentos

Ao MAPA e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Literatura citada

- ARRUDA, R.P., BARNABE, V.H., ALENCAR, M.M., BARNABE, R.C. Evaluation of frozen bull semen. Quick and slow thermoresistance tests: effects on fertility. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.29, p. 131–137, 1992.
- BARNABÉ, V.H., BARNABÉ, R.C., VISINTIN, J.S. Estudo comparativo entre as provas rápida e lenta de termo resistência para avaliação de sêmen congelado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.4, p.7-12, 1981.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.
- HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal Reproduction and Fertility*, v. 88, p.343-352, 1990.
- VIANNA, F.P., PAPA, F.O., ZAHN, F.S., DELL'AQUA JR, J.A., Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. *Animal Reproduction Science*, Brasil, v. 113, 279–282, 2009.