

APLICAÇÕES DOS TESTES DE INTEGRIDADE ACROSSÔMICA E REAÇÃO ACROSSÔMICA INDUZIDA PARA TOUROS DA RAÇA NELORE¹

D. F. Salvador^{2*}, L. A. G. Nogueira³, S. C. Salvador⁴

¹Recebido em 22/09/2018. Aprovado em 24/10/2019.

²Fundação CECIERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³Universidade Federal Fluminense – UFF, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*Autor correspondente: salvador@cecierj.edu.br

RESUMO: O objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho e a variabilidade de resultados das provas funcionais de integridade acrossômica (IA) e a reação acrossômica induzida (RAI) em touros jovens da raça Nelore, bem como verificar suas associações com outros parâmetros andrológicos. Foram avaliadas 16 amostras de sêmen congelado de touros jovens da raça Nelore utilizando-se esfregaços em lâminas pelo método de Azul Trypan / Giemsa. A média geral da integridade acrossômica pós-congelação foi de $85 \pm 6\%$, com redução para $76 \pm 8\%$ após quatro horas de incubação em banho maria a 37°C com meio de TALP HEPES com albumina. Os testes de RAI tiveram diferenças acentuadas entre os touros do experimento, com média $18 \pm 9\%$, com números máximos e mínimos de 44% a 3%. Os resultados sugerem que ambos os indutores Heparina e Heparina + Lisofosfatidilcolina (LPC) foram eficientes e devem ser utilizados nas avaliações de RAI. Na comparação entre touros de alta a baixa RAI quanto a diversos parâmetros andrológicos, houve diferença ($p < 0,05$) apenas para motilidade pré-congelação entre os grupos, com resultados superiores para os touros de baixa RAI ($\leq 17\%$). Quanto as correlações dos parâmetros andrológicos e as provas funcionais da qualidade espermática (IA e RAI), somente a motilidade espermática esteve negativamente correlacionada a RAI ($-0,51$, $p < 0,05$). Concluiu-se que os testes de integridade acrossômica e reação acrossômica induzida são importantes testes complementares para avaliação da qualidade funcional dos espermatozoides, uma vez que apresentam alta variabilidade entre touros e baixa associação com outros parâmetros andrológicos. Entretanto, os mesmos devem ser interpretados dentro dos limites de avaliação dos processos associados a qualidade espermática, e não como um indicador amplo e único da fertilidade ou capacidade fecundante de touros.

Palavras-chave: Andrologia, Sêmen, Avaliação funcional, Heparina.

APPLICATIONS OF ACROSOME INTEGRITY AND INDUCED ACROSOME REACTION TESTS TO NELORE BULLS

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the performance and variability of the results of functional tests for assessing acrosome integrity and heparin-induced acrosome reaction (IAR) in young Nelore bulls, as well as to verify their associations with other andrological parameters. Smears were prepared from 16 frozen semen samples of young Nelore bulls and stained with Trypan blue/Giemsa. The overall average post-freezing acrosome integrity was $85 \pm 6\%$, with a reduction to $76 \pm 8\%$ after 4 hours of incubation and no large variation between bulls. Marked differences between bulls of the experiment were observed for the heparin IAR tests, with an average of $18 \pm 9\%$ (range 44% to 3%). The results suggest that both heparin and heparin + lysophosphatidylcholine were efficient inducers that should be used together in IAR evaluations. Comparison of the different andrological parameters between bulls with high and low IAR showed a difference ($p < 0.05$) only for pre-freezing motility, with superior results for low IAR bulls ($\leq 17\%$). There were no correlations between the andrological parameters and functional tests of sperm quality (acrosome integrity and IAR). Only pre-freezing sperm motility was negatively correlated with IAR (-0.51 , $p < 0.05$). In conclusion, the acrosome integrity and IAR tests are important complementary tests to evaluate the functional quality of sperm since they exhibit high variability between bulls and low association with other andrological parameters. However, the tests should be interpreted within the limits of evaluation of the processes associated with sperm quality and not as a broad indicator of bull fertility or reproductive capacity.

Keywords: Andrology, Semen, Functional tests, Heparin.

INTRODUÇÃO

A seleção andrológica constitui na utilização dos exames reprodutivos de rotina dos touros para classificação reprodutiva, visando seleção de características com alta herdabilidade e com reflexos econômicos para a atividade produtiva. Porém, por vezes os exames andrológicos de rotina têm se mostrado ineficazes para escolha de touros com alto potencial fecundamente (PARRISH, 2014; SENEDA et al., 2016). Em contraponto, as avaliações que envolvam a eficiência dos processos fisiológicos associados a capacitação espermática e reação acrossômica são potenciais indicadores para seleção de touros com alta performance reprodutiva (MORANI et al., 2018; MARTINS et al., 2016).

A capacitação espermática é o processo no qual o gameta masculino passa por mudanças metabólicas e bioquímicas, no trato reprodutivo da fêmea, as quais induzem a reação acrossômica (SUAREZ, 2015). Em condições naturais, este processo parece ocorrer na junção útero tubárica, que possui fluidos específicos associados ao momento do ciclo estral pré-ovulatório, levando menor ou maior tempo, dependendo da espécie, mas sempre como um pré-requisito para a fecundação (CUNHA et al., 2019). A reação acrossômica acontece em condições naturais por indutores da zona pelúcida e progesterona e na presença de Heparina ou de forma artificial utilizando-se os indutores heparina, lisofosfatidilcolina (LPC) e inonóforo de calcio (PARRISH, 2014).

Em bovinos os polissacarídeos chamados glicosaminoglicanos (GAGs), e em especial a heparina do oviduto, promovem a capacitação do espermatozoide do touro (PARRISH, 2014; BERNECIC et al., 2019). No trato reprodutivo feminino, a capacitação espermática ocorre sempre diante de altas concentrações de GAGs do fluído folicular ovariano ou de outras fontes (KUMARESAN et al., 2019). A concentração de heparina necessária para a capacitação é semelhante ao requerido para saturar os pontos de ligação. A capacitação do espermatozoide bovino estimulado pelos glicosaminoglicanos (GAGs) necessita da maturação induzida pelo plasma seminal, visto que o plasma seminal aumenta os locais de ligação da heparina no espermatozoide epididimário, por possuir grande número proteínas ligantes de heparina (SUTOVSKY, 2010; PARRISH, 2014; PARK et

al., 2019; CUNHA et al., 2019).

Diversos autores vislumbraram a utilização das provas de reação acrossômica induzida (RAI) do sêmen a fresco ou congelado como potenciais marcadores para seleção de touros, não somente na fecundação *in vitro*, mas também para seleção de touros a campo (FELICIANO SILVA, 1998; JANUSKAUSKAS et al., 2000). Porém com o passar dos anos essa expectativa não se concretizou nas pesquisas ou a campo, trazendo certo descrédito ao potencial da inclusão desse exame nas avaliações andrológicas de rotina para touros (MONTES et al., 2012).

Den Daas (1997) avaliou a associação da capacitação espermática com a fertilidade por meio da taxa de não retorno aos 56 dias e taxa de concepção final, mostrando que a RAI contribuiu ($p > 0,05$) para as regressões das estimativas de fertilidade, diferentemente dos resultados relacionados à motilidade espermática e às técnicas de FIV, que não estiveram associadas a fertilidade após a inseminação. Já touros de alta fertilidade a campo apresentaram taxas superiores ($p < 0,001$) de blastocistos e de reação acrossômica induzida quando comparados aos de baixa fertilidade (FELICIANO SILVA, 1998), semelhante aos resultados de Blottner et al. (1990). Watanabe et al. (1999) examinaram doze touros Nelore, procurando estudar a relação entre a motilidade espermática, integridade e reação acrossômica na produção *in vitro* de embriões. Os touros diferiram significativamente para taxa de clivagem e taxa de blastocisto, ambas com correlações com a motilidade após 12 horas, integridade acrossômica e reação acrossômica.

Feliciano Silva et al. (1996) avaliaram touros das raças Nelore, Canchin e Simental, quanto a taxa de reação acrossômica induzida por heparina (RAI) e sua associação com a fertilidade. A taxa de RAI da raça Nelore variou de 14 a 47%, e em touros Simental obteve-se uma média de 38%. Os autores advogavam que o teste de RAI poderia se tornar-se um indicador importante da fertilidade de touros zebuínos.

Porém em trabalhos mais recentes, Addad et al. (2009) acompanharam touros Nelore por 3 anos usando parâmetros andrológicos e testes de viabilidade espermática, integridade de acrossoma e a fragmentação da cromatina. Os

autores relatam que os defeitos espermáticos, a integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e fragmentação de cromatina nuclear não foram frequentes a ponto de comprometer a qualidade seminal e o desempenho reprodutivo dos animais, sem relação entre os defeitos espermáticos com a integridade acrossômica ou a fragmentação da cromatina nuclear e destas com a taxa prenhez. Este trabalho levanta dúvidas quanto a real aplicação desde testes para touros saudáveis do ponto de vista reprodutivo, já previamente selecionados por outras avaliações andrológicas de rotina.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho e a variabilidade de resultados das provas funcionais de integridade acrossômica e a reação acrossômica induzida por heparina (RAI) em touros jovens da raça Nelore, bem como verificar suas associações com outros parâmetros andrológicos, discutindo possíveis aplicações e limites do seu uso para seleção reprodutiva de touros.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados o sêmen congelado de 16 touros jovens (2 anos) da raça Nelore que passaram por avaliações andrológicas de acordo com critérios do CBRA (2013), incluído a avaliação de morfologia espermática em microscopia de contraste de fase, com posterior realização da classificação andrológica por pontos (CAP) (NASCIMENTO e SANTOS, 2010).

Para a congelação do sêmen foi realizada a coleta do sêmen dos touros pelo método de eletroejaculação. Após a coleta eram realizadas as análises dos aspectos físicos do sêmen (taxa de motilidade progressiva, turbilhonamento, vigor, aspecto, volume e concentração espermática) de acordo com as normas propostas pelo CBRA (2013) e Morani et al. (2018). Para confirmação da motilidade espermática (avaliada subjetivamente ao microscópio óptico) foram realizadas avaliações de confirmação dos dados com o corante eosina-citrato (0,2g de eosina e 0,3g de citrato de sódio). Foi realizada a incubação de uma gota de sêmen com uma gota de corante por um minuto, sendo feito o esfregaço em lâmina com secagem ao fogo. Foram contados 200 espermatozoides com identificação dos

vivos (descorados) e mortos (vermelhos). Os resultados confirmaram os valores observados de motilidade espermática ao microscópio ótico.

O volume total de sêmen coletado era então homogeneizado em um recipiente único em banho maria a 35° C e diluindo em função da concentração espermática com diluente Nagase e Niwa (1963) (11,0% de lactose, 6,0% de glicerina, 20% de gema de ovo e 1mg/ml de estreptomicina e 1×10^6 UI/ml de penicilina potássica) e posteriormente envasado em temperatura ambiente em palhetes de 0,5 ml, identificados pelo número e data da coleta. De acordo com a disponibilidade do sêmen coletado, foi congelado para cada touro, um número variável de 20 a 30 doses para uso no experimento com concentração espermática do sêmen pós diluição entre 30 a 50×10^6 espermatozoides/ml.

Depois de 30 minutos de equilíbrio em temperatura ambiente era realizado o resfriamento e equilíbrio por um período de oito horas a 5°C. A congelação foi realizada após a permanência dos palhetes por 15 minutos em vapor de nitrogênio a -80°C e posterior imersão em nitrogênio líquido. As amostras foram analisadas quanto à motilidade, vigor e viabilidade pós-congelação, bem como calculado a taxa de recuperação espermática (HAFEZ, 2004), para avaliação do perfil de congelação das amostras dos touros.

Os critérios para avaliação do sêmen pós-congelação foram realizados de acordo com as recomendações do CBRA (2013). Mesmo os touros que tiveram valores abaixo do recomendado (motilidade espermática pós-congelação menor que 30% e vigor abaixo de 3) foram mantidos no experimento, com objetivo de avaliar a variabilidade e correlação dos resultados com potencial de congelação do sêmen. Dos 16 animais coletados, apenas dois tiveram motilidade e vigor pós-congelação abaixo do recomendado, resultado esperado em animais zebuínos aos dois anos de idade.

Apenas a título de caracterização da amostra, as médias e desvio padrão dos 16 animais avaliados foram de $403,0 \pm 23,0$ kg de peso corporal, $32,9 \pm 1,7$ cm de circunferência escrotal, $372,8 \pm 196,3 \times 10^6$ espermatozoides/ml de concentração espermática no ejaculado, $67,1 \pm 4,9$ % de motilidade progressiva pré-

congelção, $4,9 \pm 0,2$ de vigor pré-congelção, $26,5 \pm 9,3\%$ de motilidade progressiva pós-congelção, $4,4 \pm 0,7$ vigor pós-congelção.

A avaliação de proteínas totais no plasma seminal foi realizada com a retirada uma alíquota para dosagem de proteínas totais (PT). As mensurações foram realizadas com a metodologia de Lowry et al. (1951).

Avaliação da Integridade Acrossômica (IA)

Foram realizadas provas de avaliação da integridade acrossômica dos espermatozoides pós-congelção, utilizando-se esfregaços em lâminas, corados pelo método de Azul Trypan / Giemsa, de acordo com Didion et al. (1989). Para tanto, imediatamente após a descongelção e análise dos aspectos físicos do sêmen foi incubada uma alíquota de 200 microlitros de sêmen com diluente adicionados a 200 microlitros de Azul de Trypan a 0,2%, em banho maria a 37°C, por um período de 10 minutos. Posteriormente eram feitas 3 lavagens das células em suspensão de 1 ml em meio tampão PBS, com posterior centrifugação a 700g por 5 minutos. Foram preparados esfregaços em lâminas e secos ao ar. A coloração pelo Giemsa foi realizada por imersão durante 60 minutos, em solução a 10% diluído em água destilada com pH corrigido a 6,8.

Foram visualizados os seguintes tipos de espermatozoides na observação por microscopia óptica das lâminas coradas por Azul Trypan / Giemsa:

1. Morto com acrossoma intacto (espermatozoide azul com acrossoma corado em vermelho/rosa).
2. Morto com acrossoma degradado (espermatozoide azul com acrossoma corado em cinza/castanho-claro).
3. Vivo com acrossoma intacto (espermatozoide branco/castanho-claro com acrossoma corado em vermelho).
4. Vivo com acrossoma degradado (espermatozoide branco/castanho claro com acrossoma corado).

A taxa de integridade acrossômica pós-congelção foi calculada pela soma do percentual de espermatozoides vivos e mortos com acrossoma intacto.

Reação acrossômica induzida (RAI)

Os testes de RAI foram realizados com

uma amostra de sêmen congelado de cada um dos touros, conforme descrito por Feliciano Silva (1998). O material descongelado e contendo sêmen com diluente, foi lavado por centrifugação em meio TALP HEPES com 1% de albumina, por três vezes a 300g por 10 minutos, para retirada do diluente no sobrenadante. A concentração espermática da alíquota de espermatozoides era então novamente mensurada e feita nova diluição em meio TALP HEPES com 1% de albumina, para que todos os touros tivessem 80×10^6 espermatozoides/ml nas amostras avaliadas.

A seguir o sêmen foi dividido em três alíquotas e incubado em banho maria a 37° C por um período de quatro horas:

- 1) 250µl sêmen + 750µl TALP (controle);
- 2) 250µl sêmen + 650µl TALP + 100µl Heparina (50µg/ml);
- 3) 250µl sêmen + 550µl TALP + 100µl Heparina (50µg/ml) + 100µl Lisofosfatidilcolina (LPC, 100 µg/ml) (adicionado depois de 4:00 horas).

As leituras foram feitas a 0:00, 4:00 e 4:15 h após o início da incubação, pelo método de Azul Trypan / Giemsa, de acordo com Didion et al. (1989).

A frequência da reação acrossômica foi fornecida pelo índice de aumento da taxa de RAI do início (0:00 horas) até o final da incubação do sêmen (4:15 horas) para cada um dos dois tratamentos (Heparina ou Heparina+LPC) e controle. Para isto efetuou-se o cálculo do percentual de espermatozoides vivos sem acrossoma (verdadeira RAI) em relação ao total de vivos depois de quatro horas e quinze minutos de incubação, menos o percentual de espermatozoides vivos sem acrossoma (verdadeira RAI) em relação ao total de vivos logo após o descongelamento das amostras, conforme representação matemática abaixo:

$$RAI = ((VSA4:15/TV4:15)*100) - ((VSA0/VT0)*100))$$

Onde:

VSA4:15 = Vivos sem acrossoma, depois de 4:15 horas de incubação.

TV4:15 = Total de espermatozoides vivos depois de 4:15 horas de incubação.

VSA0:00 = Espermatozoides vivos sem

acrossoma a 0:00 horas de incubação.

VT0:00 = Total de vivos a 0:00 horas de incubação.

Análises Estatísticas

Na comparação dos grupos de touros, os dados foram organizados por delineamento inteiramente casualizado (DIC) e submetidos a análise de variância para comparação utilizando o teste SNK (SAMPAIO, 1998). Foram realizadas ainda correlações simples de Pearson entre as variáveis estudadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média geral da integridade acrossômica pós-congelamento foi de $85 \pm 6\%$, com uma redução para $76 \pm 8\%$ após quatro horas de incubação do sêmen em banho-maria a 37°C (Tabela 1). Estes valores foram próximos aos relatados por Kjaestad et al. (1993) de 81 e 73% para touros de alta e baixa fertilidade.

A avaliação de integridade acrossômica de

acordo com o método de Azul Trypan / Giemsa de Didion et al. (1989) foi eficiente para essa avaliação, sendo um método fácil e barato para uso em laboratórios de reprodução animal, podendo atuar como exame confirmatório da viabilidade espermática (vivos/mortos) e integridade morfológica do acrossomo.

Observou-se que mesmo diante de desempenho variável entre os animais quanto a taxa de recuperação espermática pós-congelamento (média 39,5% com mínima de 14% e máxima de 57%), houve pouca variação quanto a taxa de integridade acrossômica das amostras logo após o descongelamento e depois de 4h de incubação (Tabela 1).

Para os testes de RAI com Heparina e RAI com Heparina +LPC observou-se variabilidade entre os touros do experimento. A média geral de RAI com heparina+LPC foi de $18,5 \pm 9\%$, com valor máximo de 43% e mínimo de 6%. Já a média de RAI somente com Heparina foi de $18,4 \pm 9\%$, com valor máximo de 44% e mínimo de 3%. Estes resultados estão de acordo com

Tabela 1 - Resultados dos testes de integridade acrossômica e reação acrossômica induzida por heparina e Heparina+LPC.

Touro	Taxa de Recup. (%)	IA (%)	IA 4 h (%)	RAI Heparina (%)	RAI Heparina +LPC (%)
1	14	82	82	6.7	21.4
2	57	92	80	15.5	11.3
3	31	94	76	41.4	42.9
4	29	84	88	17.1	6.1
5	50	94	67	19.5	23.1
6	50	82	76	20.0	8.0
7	17	74	62	41.7	20.0
8	36	82	73	24.4	16.3
9	36	86	75	16.7	18.2
10	38	78	71	3.3	18.8
11	29	85	74	6.8	10.2
12	57	88	82	5.1	8.2
13	38	94	60	44.4	10.5
14	54	82	86	3.2	10.9
15	42	80	84	3.1	28.1
16	54	81	81	25.1	32.5
Média	39.5	85	76	18.4	18.5

Obs.: RAI = Reação acrossômica induzida; Taxa de Recup.= Taxa de recuperação espermática pós- congelamento; IA = Taxa de integridade acrossômica; IA 4h = Taxa de integridade acrossômica após 4 horas de incubação.

os valores relatados por Feliciano Silva et al. (1998), que encontraram variação de 14 a 34% de RAI para touros Nelore e 38% de média entre touros da raça Simental.

Vale destacar aqui alguns casos atípicos neste experimento, onde os resultados de Heparina foram superiores ao Heparina+LPC, notadamente nas amostras número 6, 7, 8 e 13 (Tabela 1). Isso sugere que pode haver variação individual entre reprodutores com maior ou menor sensibilidade a indução somente por Heparina (tratamento 1), ou a mistura de Heparina e LPC (tratamento 2). Porém observa-se que em ambos os tratamentos, houve o processo de indução da reação acrossômica entre os espermatozoides vivos da amostra. Esse resultado é diferente dos resultados de Costa et al. (2010) que trabalhando com os mesmos indutores (Heparina e Heparina+LPC) relatam que o tratamento com LPC não foi significativamente diferente

alíquotas separadas, sendo contabilizados os resultados de RAI para os maiores valores percentuais encontrados para um ou outro tratamento. Destaca-se que esses indutores artificiais de reação acrossômica (Heparina e LPC) apresentam-se com uma boa alternativa para o teste de RAI, conforme já proposto na literatura para touros zebuínos (FELICIANO SILVA, 1998). Apesar do ionóforo de cálcio também já ter sido relatado na literatura como indutor eficiente da reação acrossômica artificial, Assumpção et al. (2002) citam a heparina aparentemente exerce o mesmo papel e com maior eficácia, não sendo necessário a utilização do ionóforo de cálcio para testes de RAI em laboratório.

Na Tabela 2 foram comparados alguns parâmetros andrológicos (circunferência escrotal, motilidade pré-congelação e taxa de recuperação) e a integridade acrossômica entre touros de alta (< 17%) e baixa (≥ 17%) RAI.

Tabela 2 - Médias de parâmetros andrológicos, proteínas totais do plasma seminal e integridade acrossômica de touros da raça Nelore nos grupos de altas e baixas RAI.

RAI	N.	CE (cm)	MotilidadePré-cong. (%)	Taxa de Recup. (%)	PT (mg/ml)	IA (%)	RAI (%)
Alta	8	32,5 ± 1,4 a	64 ± 4 a	35 ± 14 a	26,1 ± 13,9 a	84 ± 7 a	25 ± 8 a
Baixa	8	33,4 ± 2,0 a	70 4 b	43 ± 12 a	17,0 ± 11,7 a	86 ± 5 a	11 ± 3 b

Letras diferentes nas colunas, $p < 0,05$, Teste SNK.

Obs.: RAI = Reação acrossômica induzida; CE = Circunferência escrotal; Motilidade pré- cong. = Motilidade pré-congelação; Padrão de Recup.= Padrão de recuperação espermática pós- congelação; PT = proteínas totais no plasma seminal; IA = Taxa de integridade acrossômica.

do tratamento controle nem em tempo zero após o descongelamento, nem após 4 horas em relação à proporção de espermatozoides vivos. Ou seja, para Costa et al. (2010) o LPC não demonstrou ter o efeito indutor esperado, diferente os resultados aqui encontrados.

Assumpção et al. (2002) avaliaram os protocolos de capacitação espermática *in vitro* com 100 mg/ml de heparina e 5 mM de cálcio ionóforo com melhores resultados para heparina, que apresentou melhor taxa de espermatozoides capacitados, entretanto não houve correlação entre os espermatozoides capacitados *in vitro* e a taxa de fertilidade a campo.

Os resultados deste experimento reforçam que o teste de RAI deve ser utilizado com os indutores Heparina e Heparina+LPC em

Observa-se que somente para o resultado de motilidade pré-congelação houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos de altas e baixas RAI, com resultados superiores para os touros de baixa RAI, fato confirmado pela correlação negativa de $-0,51$ ($p < 0,05$), descrita entre estas variáveis. Esta associação foi inesperada e leva a dedução de que touros com maior motilidade espermática pré-congelação apresentam menores taxas de RAI. Uma suposição é que uma alta motilidade inicial do sêmen, poderia precipitar mais precocemente os eventos de capacitação e reação acrossômica para um maior número de espermatozoides, com prejuízo aos resultados de RAI após 4 horas de incubação.

Quanto aos demais parâmetros analisados não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$),

com destaque apenas para as médias de concentração de proteínas totais (PT) que foram numericamente favoráveis aos touros de alta RAI, porém sem diferença ($p>0,05$).

Na Tabela 3 são apresentadas as correlações de Person entre os testes de IA, RAI, taxa de recuperação espermática pós-congelação e os parâmetros andrológicos dos touros. Foram observadas baixas correlações ($p>0,05$) entre a maioria dos parâmetros avaliados, mostrando baixa associação entre as principais avaliações andrológicas de rotina e as provas funcionais da qualidade espermática (IA e RAI). Apenas motilidade espermática esteve negativamente correlacionada com a RAI com valores de $-0,51$ ($p<0,05$). Já a CAP e a motilidade apresentaram-se positivamente correlacionados ($p<0,05$), associação já esperada. A integridade acrossômica não esteve correlacionada ($p>0,05$) com nenhuma outra característica reprodutiva avaliada, diferentemente do registrado por Kjaestad et al. (1993) que a mostraram correlacionada ($p<0,05$) com o vigor espermático (0,26), porém sem observar diferenças ($p>0,05$) quanto à comparação de touros de alta e baixa fertilidade.

A falta de associação das avaliações de IA e RAI com outros parâmetros andrológicos não deve ser necessariamente interpretada como ineficiência dos exames, uma vez que os mesmos avaliam apenas uma pequena parte dos

eventos associados ao processo de preparação dos espermatozoides para fecundação. Tanto na monta natural, quanto no uso de sêmen congelado, a eficiência de fecundação do sêmen pode ser compensada pela alta concentração de espermatozoides viáveis utilizados por dose. Dessa forma, para que a IA e RAI apresentem diferenças quanto aos índices de fecundação, seria necessário trabalhar em menor concentração de espermatozoides por dose (BIRCK et al., 2010; CUNHA et al., 2019), promovendo maior desafio de fecundação. Ou seja, os resultados da literatura até o momento restringem a atuação das avaliações de IA e RAI como testes complementares da qualidade funcional espermática e não em substituição a nenhuma outra avaliação andrológica.

CONCLUSÕES

Na literatura atual existe uma forte tendência na busca de múltiplos biomarcadores fisiológicos, bioquímicos e genéticos que atuem como coadjuvantes para seleção de touros para alta fertilidade e congelabilidade do sêmen, visando maior acurácia na predição da fertilidade de reprodutores bovinos, tanto a campo, quanto nos processos de fecundação *in vitro* (PARK et al., 2019). Porém, é necessária a realização de mais experimentos que comprovem a real associação destes testes e marcadores com o potencial de fecundação

Tabela 3 - Correlações e graus de significância (entre parênteses) entre parâmetros andrológicos, proteínas totais, IA e RAI de touros da raça Nelore.

	CE (Cm)	Mot.(%)	PT	CAP	Taxa de Recup.(%)	IA 0:00 h	IA 4:00 h
Mot. (%)	0,14 (0,58)	-	-	-	-	-	-
PT	-0,33 (0,20)	-0,01 (0,95)	-	-	-	-	-
CAP	0,46 (0,07)	0,54 (0,02)	-0,30 (0,24)	-	-	-	-
Taxa de Recup.(%)	0,22 (0,41)	0,10 (0,69)	0,01 (0,94)	-0,01 (0,94)	-	-	-
IA 0:00 h	-0,04 (0,85)	0,03 (0,91)	-0,16 (0,55)	-0,08 (0,75)	0,31 (0,23)	-	-
IA 4:00 h	0,25 (0,34)	0,29 (0,27)	-0,26 (0,31)	0,12 (0,63)	0,25 (0,34)	-0,13 (0,61)	-
RAI (%)	-0,36 (0,16)	-0,51 (0,04)	0,26 (0,32)	-0,47 (0,06)	-0,22 (0,40)	0,05 (0,85)	0,03 (0,89)

Obs.: CE = circunferência escrotal; Mot. = Motilidade; PT = Proteínas totais no plasma seminal; CAP = classificação andrológica por pontos; Taxa de Recup. = Padrão de recuperação espermática pós- congelação; IA = integridade acrossômica; RAI = Reação acrossômica induzida. As correlações em itálico têm significância ($p<0,05$).

para touros zebuínos, bem como verifique as suas associações com os demais parâmetros andrológicos e a fertilidade.

A partir dos resultados deste experimento podemos concluir que o teste de RAI com Heparina + LPC apresentou alta variabilidade entre touros jovens da raça Nelore, porém com uma baixa correlação com os parâmetros andrológicos, com a taxa de integridade acrossômica e o sucesso na congelamento do sêmen (taxa recuperação espermática pós-congelamento). Entretanto, o exame de RAI podem trazer informações complementares importantes sobre qualidade espermática funcional dos espermatozoides ligadas ao processo de capacitação e reação acrossômica (SUTOVSKY, 2010; PARRISH, 2014; SUAREZ, 2015; CUNHA et al., 2019).

A falta de associação direta da avaliação de RAI, e por consequência dos processos de capacitação e reação acrossômica, com os exames andrológicos de rotina e o sucesso na congelamento de sêmen não desqualifica o uso dos testes de RAI como exame complementar (MONTES et al., 2012). Na verdade, reforça a utilização do mesmo para seleção de touros de alto potencial fecundante, como por exemplo, para identificação e seleção de reprodutores que terão desempenho superior nos processos de fecundação *in vitro* (SENEDA et al., 2016; CUNHA et al., 2019). Ressalta-se, porém, que os mesmos devem ser interpretados dentro dos limites de avaliação dos processos associados a qualidade funcional espermática para capacitação e reação acrossômica, e não como um indicador amplo e único da fertilidade ou capacidade fecundante de touros.

REFERÊNCIAS

- ADDAD, R.; FRENEAU, G.; RESENDE, L.; SILVA, L. Avaliação clínico-andrológica em touros nelore e testes de viabilidade espermática, integridade de acrossoma e fragmentação de cromatina ao longo de três estações reprodutivas. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p. 1044-1054, 2009.
- ASSUMPÇÃO, M.E.O.D.; HAIPECK, K.; LIMA, A.S.; MELLO, M.R.B.; OLIVEIRA, L.J.; OLIVEIRA, V.P.; 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**, São Paulo, v.39, p. 149-156, 2002. <https://doi.org/10.1590/s1413-95962002000300008>
- BERNECIC, N.; GADELLA, B.; LEAHY T.; GRAAF, S. Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa. **Theriogenology**, v.137, p.56-66, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.038>
- BIRCK, A.; CHRISTENSEN, P.; LABOURIAU, R.; PEDERSEN, J.; BORCHERSEN, S. In vitro induction of the acrosome reaction in bull sperm and the relationship to field fertility using low-dose inseminations. **Theriogenology**, v.73, p.1180-1191, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.010>
- BLOTTNER, S.; NEHRING, H.; TORNER, H. Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin *in vitro*: relationship to fertility. **Theriogenology**, v.34, n.3, p.619-628, 1990. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(90\)90017-n](https://doi.org/10.1016/0093-691x(90)90017-n)
- CUNHA, A.T.M.; CARVALHO, J.O.; GUIMARÃES, A.L.S.; LEME, L.O.; CAIXETA, F.M.; VIANA, J.H.M. Bovine epididymal spermatozoa treatment for *in vitro* fertilization: Heparin accelerates fertilization and enables a reduction in incubation time. **PLoS ONE**, 14, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209692>
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 103p.
- COSTA, M.Z.; OLIVEIRA, L.Z.; RESENDE, M.V.; LUCIO, A.C.; PERINI, A.P.; MIGUEL, M.C.V.; LIMA, V.F.M.H. Induction of the acrosome reaction test to *in vitro* estimate embryo production in Nelore cattle. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 771-777, 2010. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352010000400001>
- DEN DAAS, J.H.G. **Prediction of bovine Male Fertility**. 1997. 168p.
- DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R.; GILES, J.R.; GRAVES, C.N. Staining procedures to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Reserch**, v.22, p.51-57, 1989. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(90\)90017-n](https://doi.org/10.1016/0093-691x(90)90017-n)

- org/10.1002/mrd.1120220106
- FELICIANO SILVA, A.E.D. **Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e biotecnologia, 1998. 38p., documento 35.
- FERNANDES, C. E.; SOUZA, F. F.; SOUZANETO, J. A.; RIBOLA, P. E. M. Heparin-binding proteins of seminal plasma in Nelore bulls. **Ciência Rural**, v.39, 2009. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782008005000044>
- HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7ª ed. São Paulo: Ed. Manole, 2004. 513p.
- GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R., FIGUEIRÊDO FREITAS, V. J. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Editora Roca, 2008.
- JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SODERQUIST, L. Relationship between sperm response to glycosaminoglycans in vitro and Non-return rates of Swedish dairy AI bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, p.207-212, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2000.00212.x>
- LI, C., WANG, D., ZHOU, X. Sperm proteome and reproductive technologies in mammals. **Animal Reproduction Science**, v.173, p.1-7, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.08.008>
- KJÆSTAD, H.; ROPSTAD, E.; ANDERSEN, K.B. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.34, p.299-303, 1993.
- KUMARESAN, A.; JOHANNISSON, A.; HUMBLOT, P.; BERGQVIST, A.S. Effect of bovine oviductal fluid on motility, tyrosine phosphorylation, and acrosome reaction in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.124, p.48-56, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.028>
- LOWRY, O.H.; ROSENBOUGH, N.J.; FARS, A.L. Proteins measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- MORANI, E.S.C.; RODRIGUES, L.H.; RONCOLETTA, M. **Manual de reprodução nas espécies domésticas: Avaliação e empregabilidade do sêmen, v.1**. São Paulo: Medvep, 2018. 232p.
- NAGASE, H.; NIWA, T. Studies on deep freezing technique for bull semen. III. Deep freezing of bull semen in tablet form. **The Japanese journal of animal reproduction**, v.9, p.93, 1963.
- NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2010. 172p.
- MONTES, J.; TORRES, M.; RUGELES, C.; ALMANZA, R.; GUIMARÃES, J. In vitro induction with heparin of acrosome Reaction in frozen Brahman and Gyr bulls semen. **Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica**, v.15, p.431 - 436, 2012.
- PALHANO, H.B. **Reprodução em bovinos-fisiopatologia, terapêutica, manejo e biotecnologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora LF Livros, 2008. p.181-224.
- PARRISH, J.J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v.81, p.67-73, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>
- PARK, Y.J.; PANG, W.K.; RYU, D.Y.; SONG, W.H.; RAHMAN, M. S.; PANG, M.G. Optimized combination of multiple biomarkers to improve diagnostic accuracy in male fertility. **Theriogenology**, v.139, p.106-112, 2019.
- SENEDA, M. M., SILVA-SANTOS, K. C., MARINHO, L.S. R. **Biotechnology of animal reproduction**. New York: Nova Science Publisher's, Inc., 2016.
- SUAREZ S.S. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. **Cell and tissue research**, v.363, p.185-194, 2015.
- SUTOVSKY, P. **Sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertilization**. In: Douglas Carrell, M.P. (ed.). **Reproductive endocrinology and infertility: integrating modern clinical and laboratory practice**. New York, NY: Springer Science + Business Media, LLC, 2010. p. 389-421.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998.
- WATANABE, Y.F., WATANABE, M.R., FRANCESCHINI, P.H. Relação entre a motilidade espermática e características do acrossoma na produção in vitro de embriões em Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, 1999.