



Características do sêmen congelado relacionadas à fertilidade *in vitro* em bovinos *Frozen semen characteristics associated to in vitro fertility in cattle*

R.L.P. Arruda¹, C.E.S.N. Zúccari^{2,6}, C.E. Fernandes³, U.G.P. Abreu⁴, E.V. Costa e Silva⁵

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

²Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, FAMEZ, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

³Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

⁴Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil.

⁵Laboratório de Reprodução Animal, FAMEZ, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

⁶Correspondência: carmem.zuccari@ufms.br

Resumo

Objetivou-se verificar se há associação entre as técnicas laboratoriais de avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides congelados de touros usados na produção *in vitro* de embriões e as taxas de clivagem e de blastocistos. Amostras de sêmen congelado bovino ($n = 39$) foram avaliadas em 89 ensaios de fecundação *in vitro*, sendo consideradas apenas aquelas que possuíam um número ≥ 20 ovócitos, totalizando 2.738 ovócitos. Pós-*Percoll*[®] recuperou-se uma maior população de espermatozoides móveis e com membranas plasmática e acrossomal íntegras ($P < 0,05$). O percentual de células mortas e com reação acrossomal verdadeira (RAV) (FITC-PNA) explicou 25% da variação da taxa de clivagem. Vigor, percentual de vivos (eosina/nigrosina), vivos e RAV (*trypan blue*/Giemsa) e mortos e RAV (FITC-PNA) explicaram 41% da variação da taxa de blastocistos. A eficácia da produção *in vitro* de embriões está relacionada com diferentes atributos espermáticos, especialmente com aqueles associados à integridade da estrutura das membranas plasmática e acrossomal.

Palavras-chave: acrossomo, espermatozoide, fertilidade, membrana plasmática.

Abstract

*The aim of this work was to verify if laboratory techniques used to evaluate plasmatic and acrosomal membrane integrity of bovine frozen semen used in in vitro embryo production were associated with cleavage and blastocyst rates. Bovine frozen semen samples ($n = 39$) had been evaluated in 89 assays of fertilization in vitro being considered only those with ≥ 20 oocytes, with a total of 2,738 oocytes. After-*Percoll*[®] highest populations of motile spermatozoa were recovered, with intact plasmatic and acrosomal membranes ($P < 0.05$). The percentage of dead cells and those with true acrosomal reaction (TAR) (FITC-PNA) had explained 25% of the variation of the cleavage rate. Vigor, percentage of live (nigrosin/eosin), live and TAR (*trypan blue*/Giemsa), dead and TAR (FITC-PNA) had explained 41% of the variation of blastocyst rate. The effectiveness of in vitro embryo production is related with different spermatic attributes, especially with those associates to the structural integrity of plasmatic and acrosomal membranes.*

Keywords: acrosome, fertility, plasmatic membrane, spermatozoa.

Introdução

A avaliação da qualidade seminal apresenta como objetivos principais prever o grau de fertilidade em indivíduos sem prévio conhecimento, determinar aqueles de maior fertilidade dentro de um grupo com fertilidade conhecida e, se possível, estabelecer características confiáveis, repetitivas e de fácil comparação entre indivíduos (Amann e Hammerstedt, 2002). Neste sentido, muitos testes laboratoriais têm sido desenvolvidos com a finalidade de identificar aspectos pertinentes à composição estrutural e funcional da célula espermática.

Embora esses testes sejam considerados indicadores indiretos da fertilidade, os critérios para avaliação seminal incidem sobre o fato de que a população espermática é heterogênea entre indivíduos e entre ejaculados do mesmo indivíduo. Isto limita a seleção de uma variável ou de um atributo seminal que seja representativo da população espermática como o mais adequado para estimar a qualidade seminal (Amann, 1989; Den Daas, 1992). Com base nessas observações, Amann e Hammerstedt (1993) mostraram a importância da análise combinada de vários atributos (*combined effective amount*), com o objetivo de estabelecer subpopulações distintas e classificá-las como suficientes ou insuficientes em relação à fertilidade.

A determinação dessas relações tem possibilitado avanços na avaliação seminal, especialmente no que tange à organização, diferenciação e dinâmica das membranas que envolvem as diferentes regiões do



espermatózoide, na integridade acrossomal e nuclear, nos fenômenos bioquímicos que afetam a função espermática durante a maturação e passagem epididimal, bem como no processo de capacitação ao longo do aparelho reprodutivo da fêmea até o sítio da fecundação (Sailer et al., 1996; Flesh e Gadella, 2000).

Soma-se a essa complexidade o fato de que as células espermáticas sofrem diferentes efeitos deletérios decorrentes dos processos de criopreservação e armazenamento (Holt, 2000). Esses efeitos caracterizam-se, entre outros, pela desestabilização da membrana plasmática e elevação da concentração de cálcio intracelular, semelhante ao que ocorre durante a capacitação espermática. Considerando que o espermatozoide capacitado e/ou com acrossomo reagido possui um limitado tempo de vida, isso resulta em diminuição da fertilidade (Yanagimachi, 1994). Portanto, mesmo com as técnicas atuais de congelamento, em média, obtém-se, pós-descongelamento, metade da população espermática viável (Watson, 1995).

Com o aumento dos programas de produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a valorização genética e econômica dos reprodutores usados nesses programas, associados aos custos ainda elevados de produção, torna-se necessária a adoção de métodos eficientes para a avaliação do sêmen congelado. Sob esse aspecto, o desenvolvimento de provas laboratoriais, visando avaliar com maior acurácia o desempenho de partidas de sêmen, tem sido a meta de numerosos programas de pesquisa no campo da inseminação artificial. Deste modo, diversos testes complementares têm sido desenvolvidos para avaliar a integridade da membrana plasmática, o *status* acrossomal e a integridade da cromatina, dentre outros (De Jonge, 1999; Evenson et al., 2002).

O presente estudo teve como objetivo verificar se há associação entre as técnicas laboratoriais de avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal do espermatozoide congelado de touros usados na PIVE e as taxas de clivagem e de blastocistos.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido junto ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAMEZ/UFMS), em parceria com a Embriza – Laboratório de Biotecnologia de Embriões, empresa privada prestadora de serviços em reprodução animal, sediada em Campo Grande/MS.

Amostras de sêmen congelado de touros da raça Nelore (n = 39) foram utilizadas em 89 ensaios de PIVE. Foram consideradas apenas as PIVEs que possuíam um número maior ou igual a 20 ovócitos, totalizando 2.738 ovócitos.

Análises laboratoriais

Os procedimentos relativos à produção *in vitro* dos embriões e as análises da motilidade (%) e vigor (0-5) espermáticos foram efetuados de acordo com os procedimentos de rotina do Laboratório de Biotecnologia de Embriões da Embriza, conforme as normas previamente estabelecidas pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (Stringfellow e Seidel, 1999).

As avaliações do sêmen foram realizadas em dois momentos: pós-descongelamento (PD) e após a seleção espermática em gradiente descontínuo de *Percoll*[®] (PP). Os testes para o estudo da integridade das membranas plasmática (eosina/nigrosina) e acrossomal (FITC-PNA/IP e *trypan blue*/Giemsa) foram executados no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da FAMEZ/UFMS.

Gradiente de Percoll[®]

Foram preparados dois gradientes, a 90 e 45%, em meio Talp-sp, a partir do *Percoll*[®] comercial. Em tubo cônico de 15 mL, foram depositados 2 mL de *Percoll*[®] a 90% e, sobre ele, lentamente, o mesmo volume de *Percoll*[®] a 45% (Parrish et al., 1995). O gradiente descontínuo de *Percoll*[®] foi mantido em banho-maria até o momento em que se depositou o sêmen em sua porção superior, e, então, o material foi centrifugado a 700 G durante 30 minutos.

Colheita e maturação de ovócitos in vitro

Ovócitos de fêmeas Nelore foram obtidos por meio da técnica de aspiração de folículos *in vivo* guiada por ultrassom, nos meses de fevereiro, março, abril, novembro e dezembro. Os ovócitos aspirados foram lavados em solução tampão fosfato, suplementados com 10% de soro bovino fetal e antibiótico. Somente ovócitos contendo uma ou mais camadas de células do *cumulus* e citoplasma uniforme foram utilizados para maturação. Os ovócitos foram lavados e transferidos para uma gota de meio de maturação coberta com óleo mineral, ficando em estufa por 24 h a 38,5°C em atmosfera a 5% de CO₂. Após a maturação, os ovócitos foram avaliados quanto à expansão e coloração das células do *cumulus*, uniformidade de coloração do citoplasma e, então, submetidos à fecundação *in vitro*.



Fecundação in vitro

Após a maturação os ovócitos foram separados em grupos de 25 a 30, lavados e transferidos para gotas de 200 µL contendo meio de fecundação (TALP suplementado com solução PHE e heparina). O sêmen descongelado foi submetido à passagem pelo gradiente descontínuo de *Percoll*[®]. Pós-gradiente, estimava-se a concentração espermática de forma que cada gota de fecundação recebesse 1×10^6 de espermatozoides por mL. Ovócitos e espermatozoides foram coincubados por 18 h em estufa a 38,5°C e sob atmosfera a 5% de CO₂ em ar. Após a coincubação, os possíveis zigotos foram retirados da gota de fecundação, lavados em meio de cultivo e distribuídos nas placas de cultivo.

Para o cultivo *in vitro*, as placas foram preparadas no dia anterior, utilizando-se o fluido sintético da tuba uterina. Para fins de análise, considerando-se o dia 0 (D0) como o dia da fecundação, os embriões foram avaliados em D2 para as frequências de clivagem (presença de divisão celular) e em D7 para as de blastocistos (estruturas viáveis do tipo inicial, expandido e eclodido).

Eosina/nigrosina - EN

A avaliação da integridade da membrana plasmática foi feita em esfregaço de sêmen corado pela eosina/nigrosina (1:1), conforme Barth e Oko (1989). A eosina penetra através da membrana plasmática lesada e cora as células mortas (ENM) em rosa, e a nigrosina, ao dar o contraste de fundo, permite detectar espermatozoides vivos (ENV) não corados. Foram contadas 200 células por lâmina, em microscópio óptico de campo claro (Axiolab, Zeiss, Alemanha), no aumento de 400x.

Integridade do acrossomo - FITC-PNA/IP

A integridade do acrossomo foi avaliada empregando-se a técnica descrita por Nagy et al. (2003), associando-se a aglutinina de *Arachis hypogaea* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA) e o iodeto de propídeo (IP). A lecitina do FITC-PNA tem afinidade pela membrana acrossomal externa, portanto, para que ocorra sua ligação, é necessário que a membrana plasmática se encontre permeável. O iodeto de propídeo é um corante para ácido nucleico que só ingressa em células com membrana plasmática lesada, desta forma é um indicador de espermatozoides mortos, corando-os em vermelho. A solução de trabalho foi preparada no dia de sua utilização, sendo composta de 240 µL de citrato de sódio (3%), 2,5 µL de formalina (1:80), 2,5 µL da solução estoque de IP (Sigma Aldrich do Brasil) e 5 µL da solução estoque de FITC-PNA (Sigma Aldrich do Brasil). As soluções de fluorocromos foram mantidas ao abrigo da luz em *ependorf* envolto por papel-alumínio e mantidas a -20°C. As soluções de formaldeído e citrato de sódio foram estocadas sob refrigeração a 5°C. As soluções utilizadas no preparo da solução de trabalho encontravam-se à temperatura ambiente no momento da realização do ensaio. O material a ser avaliado era acondicionado em *ependorf* recoberto por papel-alumínio, devidamente identificado, mantido à temperatura ambiente, na proporção de 40 µL da solução de trabalho para 10 µL de sêmen.

A integridade do acrossomo foi avaliada em preparação úmida entre lâmina e lamínula, sob microscopia de epifluorescência (Axioskop, Zeiss, Alemanha), em aumento de 400x, alternada com microscopia de campo claro, contando-se 200 células por lâmina, que foram classificadas, quanto ao padrão de coloração, em quatro categorias: vivos (PNAV) – não se coram –, visíveis apenas em microscopia de campo claro; mortos (PNAM) – núcleos corados em vermelho pelo IP; reação do acrossomo verdadeira (PNARAV) – acrossomo corado em verde pelo FITC-PNA; e reação do acrossomo falsa (PNARAF) – núcleo corado em vermelho pelo IP e o acrossomo em verde pelo FITC-PNA.

Trypan blue/Giemsa - TBG

Para determinar simultaneamente a integridade da membrana plasmática e o *status* acrossomal, foi empregada a técnica descrita por Didion et al. (1989). O *trypan blue* é um corante vital que detecta espermatozoides mortos com membrana lesada, corando-os em azul, enquanto os íntegros não se coram. Já o Giemsa indica a presença ou ausência do acrossomo, corando em rosa os acrossomos intactos. Em tubo cônico, eram armazenados 20 µL de *trypan blue* 0,4% (Sigma Aldrich do Brasil) acrescidos de 20 µL de sêmen e incubados em banho-maria (MD 100 - Fanem[®]) a 37°C, por 15 min. Após, foram adicionados 2 mL de Talp-sp, e as amostras submetidas à centrifugação (Excelsa Baby I - Fanem[®], Brasil) por 15 min a 800 G, por duas vezes. O *pellet* era ressuspenso, o esfregaço confeccionado e a lâmina seca à temperatura ambiente. Após serem fixadas em metanol por 5 min e estarem secas, as lâminas eram imersas *overnight* em solução corante de Giemsa, preparada em cubeta plástica com 27 mL de água deionizada acrescida de 3 mL da solução estoque de Giemsa (Merck). Após esse período, as lâminas eram lavadas com água deionizada, secas e 200 células eram avaliadas em microscópio de campo claro (Axiolab, Zeiss, Alemanha), no aumento de 1000x sob imersão. Os espermatozoides foram classificados como: vivos (TBGV) – acrossomo corado em rosa pelo Giemsa e região pós-acrossomal não corada; mortos (TBGM) – acrossomo corado em rosa e região pós-acrossomal corada em



azul escuro pelo *trypan blue*; reação do acrossomo verdadeira (TBGRAV) – acrossomo e região pós-acrossomal não corados; e reação do acrossomo falsa (TBGRAF) – acrossomo não corado e região pós-acrossomal corada em azul.

Análise estatística

Previamente, os dados do sêmen e as taxas de clivagem e de blastocistos foram analisados quanto à normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov, ajustado para Lilliefors), procedendo-se à transformação por ranque (*rank cases*) nas variáveis com $P < 0,05$. Devido à alta variância intratouro e com o objetivo de controlá-la, foi usada a média dos resultados para os touros avaliados mais de uma vez. Além disso, a análise de resíduos detectou quatro touros com dados discrepantes (*outliers*), sendo retirados da análise estatística. Desta forma, o universo amostral totalizou os dados referentes a 39 amostras seminais e 89 sessões de FIV, totalizando 2.738 ovócitos.

O efeito do gradiente de *Percoll*[®] sobre as variáveis seminais foi estimado pela análise de variância (modelo linear univariado). A relação entre as taxas de clivagem e de blastocistos (variáveis dependentes) e as características laboratoriais do sêmen (variáveis independentes) foi estimada pela análise de regressão linear múltipla (*backward*) para os dados obtidos pós-*Percoll*[®].

Resultados

Os valores de motilidade, vigor e espermatozoides vivos, de acordo com a coloração pela eosina/nigrosina, aumentaram significativamente após a passagem pelo gradiente de *Percoll*[®]. As categorias de vivos e reação do acrossomo verdadeira, do *trypan blue*/Giemsa, apresentaram resultados superiores no momento pós-*Percoll*[®] ($P < 0,05$), e a porcentagem de células mortas decresceu ($P < 0,05$), enquanto o número de células que apresentou falsa reação do acrossomo não diferiu entre os momentos estudados. Na avaliação do *status* acrossomal, pelo FITC-PNA/IP, as porcentagens de espermatozoides vivos e mortos não diferiram significativamente entre os momentos pós-descongelamento e pós-*Percoll*[®], já o valor médio de PNARAV praticamente triplicou, enquanto aquele referente à PNARAF sofreu uma redução de cerca de 50% pós-*Percoll*[®] ($P < 0,05$). Na Tab. 1, são apresentados os valores médios (\pm desvio-padrão) das características seminais analisadas após a descongelamento e a seleção em gradiente de *Percoll*[®].

Tabela 1. Valores médios (\pm desvio-padrão) de motilidade, integridade da membrana plasmática e *status* acrossomal para o sêmen de touros Nelore (n = 39), nos momentos pós-descongelamento e pós-*Percoll*[®].

Variáveis (%)	Pós-descongelamento	Pós- <i>Percoll</i> [®]
Motilidade	19,41 \pm 7,32 ^a	50,73 \pm 10,90 ^b
Vigor (escore 0-5)	1,35 \pm 0,54 ^a	2,75 \pm 0,52 ^b
EN-Vivos	60,53 \pm 16,42 ^a	72,12 \pm 12,19 ^b
EN-Mortos	39,45 \pm 16,42 ^a	27,89 \pm 12,18 ^b
TBG-Vivos	61,47 \pm 12,17 ^a	68,42 \pm 11,87 ^b
TBG-Mortos	31,42 \pm 12,31 ^a	19,05 \pm 10,24 ^b
TBG-RAV	2,74 \pm 2,30 ^a	6,74 \pm 6,20 ^b
TBG-RAF	4,40 \pm 3,36 ^a	5,88 \pm 5,00 ^a
PNA-Vivos	42,88 \pm 13,42 ^a	50,23 \pm 16,80 ^a
PNA-Mortos	19,91 \pm 8,72 ^a	17,26 \pm 10,01 ^a
PNA-RAV	5,58 \pm 5,27 ^a	14,40 \pm 16,03 ^b
PNA-RAF	32,14 \pm 11,88 ^a	18,13 \pm 10,11 ^b

*EN - eosina/nigrosina; TBG - *trypan blue*/Giemsa; PNA - aglutinina do amendoim (*Arachis hypogaea*) conjugada ao isotiocianato de fluoresceína; RAV - reação acrossomal verdadeira; RAF - reação acrossomal falsa.

**Letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste *t* de Student ($P < 0,05$).

Desta forma, constatou-se que a passagem pelo gradiente de *Percoll*[®] foi eficaz na seleção de populações espermáticas com maior motilidade e maior integridade das membranas plasmática e acrossomal.

As variáveis TBGV, PNAV, PNAM e PNARAV foram positivamente associadas à taxa de clivagem e explicaram cerca de 25% ($R^2 = 0,25$; $P = 0,008$) de sua variação (Tab. 2). Já as variáveis vigor, ENV, TBGV, TBGRAV, TBGRAF, PNAV, PNAM e PNARAV foram associadas à taxa de blastocistos e explicaram 41% ($R^2 = 0,41$; $P = 0,006$) de sua variação (Tab. 3). As taxas médias de clivagem e de blastocistos foram 68,23 \pm 23,22% e 41,96 \pm 23,93%, respectivamente.

Tabela 2. Modelos estimados com base na análise de regressão linear múltipla (*backward*) para a relação entre a taxa de clivagem e as variáveis seminais do sêmen congelado de touros Nelore após passagem em gradiente de Percoll®.

Modelo	Variáveis	Coefficientes	β	t	P
1	(Constant)	23.188		0.927	0.361
	TBGV	0.133	0.102	0.603	0.551
	PNAV	0.37	0.203	0.792	0.434
	PNAM	-0.787	-0.479	-2.343	0.026
	PNARAV	1.025	0.588	2.42	0.021
R ²	0,23				0.039
2	(Constant)	38.222		3.54	0.001
	PNAM	-0.608	-0.37	-2.391	0.022
	PNARAV	0.779	0.447	2.891	0.007
R ²	0,25				0.008

TBGV - *trypan blue*/Giemsa (vivos); PNAV - aglutinina do amendoim (*Arachis hypogaea*) conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (vivos); PNAM - mortos; PNARAV - reação acrossomal verdadeira.

β = coeficiente angular padrão; t = teste *t* de Student; P = P-value.

Tabela 3. Modelos estimados com base na análise de regressão linear múltipla (*backward*) para a relação entre a taxa de blastocistos e as variáveis espermáticas do sêmen congelado de touros Nelore após passagem em gradiente de Percoll®.

Modelo	Variáveis	Coefficientes	β	t	P
1	(Constant)	21.021		-0.692	0.495
	VIGOR	0.698	0.483	3.101	0.004
	ENV	0.406	0.33	1.76	0.089
	TBGV	0.237	0.233	0.905	0.373
	TBGRAV	0.147	0.139	0.762	0.452
	TBGRAF	0.137	0.12	0.501	0.62
	PNAV	0.05	0.04	0.146	0.885
	PNARAV	0.531	0.388	1.608	0.119
R ²	0,41				0.035
2	(Constant)	18.946		-0.717	0.479
	VIGOR	0.695	0.48	3.158	0.004
	ENV	0.417	0.339	1.95	0.061
	TBGV	0.224	0.22	0.923	0.363
	TBGRAV	0.141	0.134	0.761	0.453
	TBGRAF	-0.139	-0.122	-0.517	0.609
	PNAM	-0.652	-0.505	-3.04	0.005
	PNARAV	0.494	0.362	2.302	0.029
R ²	0,41				0.019
3	(Constant)	7.737		-0.518	0.608
	VIGOR	0.662	0.458	3.18	0.003
	ENV	0.385	0.313	1.904	0.067
	TBGV	0.307	0.302	1.714	0.097
	TBGRAV	0.15	0.142	0.82	0.418
	PNAM	-0.623	0.483	-3.046	0.005
	PNARAV	0.48	0.351	2.282	0.003
R ²	0,41				0.006

ENV - eosina/nigrosina (vivos); TBGV - *trypan blue*/Giemsa (vivos); TBGRAV - reação acrossomal verdadeira; TBGRAF - reação acrossomal falsa; PNAV - aglutinina do amendoim (*Arachis hypogaea*) conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (vivos); PNAM - mortos; PNARAV - reação acrossomal verdadeira; β = coeficiente angular padrão; t = teste *t* de Student; P = P-value.

Discussão

Na reprodução *in vivo*, os espermatozoides férteis são selecionados durante a migração através do trato reprodutivo feminino. Contudo, quando são utilizadas técnicas de reprodução *in vitro*, a população espermática a ser utilizada é potencializada por métodos de seleção (Parrish et al., 1995). Entre os métodos utilizados, o gradiente de *Percoll*[®] possibilita a remoção do diluente de congelamento, de alguns agentes infecciosos, assim como seleciona uma população de espermatozoides com maior motilidade. Isso é possível devido à presença de partículas coloidais de sílica recobertas por polivinilpirrolidona, que se ligam aos espermatozoides de acordo com sua densidade, estágio de maturação e integridade (Oshio, 1998; Pertoft, 2000). Espermatozoides mortos, imóveis ou com alterações na membrana plasmática apresentam carga positiva e se ligam facilmente à polivinilpirrolidona (carga negativa), ficando retidos durante os processos de incubação e centrifugação (Anzar e Graham, 1996). Além disso, esse método não tem efeito tóxico, o que permite resultados semelhantes quando comparado a outros métodos (Dode et al., 2002; Somfai et al., 2002; Mendes Jr. et al., 2003). No presente estudo, o gradiente de *Percoll*[®] mostrou-se eficaz na obtenção de uma maior população de gametas móveis, conforme previamente descrito (Tanghe et al., 2002; Cesari et al., 2006; Samardzija et al., 2006; Mehmood et al., 2009; Carvalho et al., 2010), validando a utilização desse método na seleção espermática em sistemas comerciais de produção *in vitro* de embriões. Ressalta-se, porém, que as amostras utilizadas são de animais com parâmetros seminais morfológicos superiores e homogêneos, o que favorece a qualidade das subpopulações selecionadas (Parrish et al., 1995). Por outro lado, também deve ser considerado o movimento cinético dos espermatozoides, pois, embora touros com espermatozoides mais rápidos tenham apresentado a mesma taxa de fertilidade *in vitro* que aqueles com células mais lentas, as taxas de penetração, após quatro horas da inseminação, e de polispermia foram significativamente maiores nos espermatozoides mais rápidos e naqueles que permaneceram coincubados com os ovócitos por períodos mais longos. Os resultados demonstram que a adaptação do tempo de coincubação dos gametas, de acordo com a cinética espermática, pode ser favorável à capacidade de fecundar do espermatozoide bovino (Sattar et al., 2011).

No presente trabalho, foram usadas algumas técnicas de coloração que possuem uma alta e significativa correlação entre si e avaliam as mesmas estruturas espermáticas, como o *status* acrossomal e a integridade da membrana plasmática (Zúccari et al., 2008, 2009, respectivamente). O intuito de empregá-las em um mesmo experimento se deve ao fato de os diferentes laboratórios disporem de equipamentos diversos para a realização de seus trabalhos de pesquisa. Sem dúvida, a citometria de fluxo é hoje o método de excelência, pois avalia milhões de células em um tempo muito reduzido, mas tem como empecilho o seu alto custo. No caso das sondas fluorescentes, emprega-se a microscopia de epifluorescência que é bem menos onerosa, mas, em contrapartida, requer a leitura imediata das amostras. Já para o uso dos corantes vitais não fluorescentes, a microscopia óptica de campo claro é suficiente e tem como vantagem o armazenamento das amostras fixadas, o que permite que se faça a confecção das lâminas em nível de campo e posterior leitura em momento mais conveniente. Assim, pode-se verificar que os modelos estimados contemplaram variáveis referentes às diferentes técnicas empregadas.

O percentual de células vivas obtido pela coloração com eosina/nigrosina foi superior ($P < 0,05$) pós-*Percoll*[®], comprovando ser um método supravital eficaz na avaliação espermática (Tanghe et al., 2002). O percentual de células vivas com acrossomo intacto analisado pelas sondas fluorescentes FITC-PNA/IP não diferiu entre os momentos estudados, conforme relatado por Carvalho et al. (2010), ao contrário da coloração com *trypan blue*/Giemsa. Da mesma forma, Somfai et al. (2002) e Zúccari et al. (2008) verificaram maiores percentuais a favor da coloração de *trypan blue*/Giemsa no sêmen congelado bovino. A discrepância observada entre os resultados das técnicas do *trypan blue*/Giemsa e FITC-PNA/IP se deve, possivelmente, à lenta passagem do *trypan blue* através da membrana plasmática, o qual requer cerca de 15 min, podendo, assim, superestimar a população de vivos (Talbot e Chacon, 1981). Por outro lado, as diferenças podem estar na maior sensibilidade do fluorocromo, resultando no aumento da intensidade e do contraste à coloração, gerando menor ambiguidade que o *trypan blue* durante a avaliação microscópica (Cesari et al., 2006).

Dos métodos usados para avaliação da fertilidade do macho, a fecundação *in vitro* tem sido descrita como uma ferramenta importante na medida em que permite análises diretas da capacidade dos espermatozoides de realizarem diferentes etapas ligadas ao processo de fecundação, clivagem e desenvolvimento embrionário, tais como habilidade em se ligar à zona pelúcida e sofrer reação acrossomal, penetrar a zona pelúcida, descondensar o núcleo, promover a singamia e a divisão celular (Yanaghimachi, 1994; Sudano et al., 2011).

Assim, atributos importantes da estrutura espermática, como a integridade das membranas plasmática e acrossomal, são fundamentais para o processo, especialmente na produção *in vitro* de embriões (Amann e Hammerstedt, 1993; Muller, 2000; Mehmood et al., 2009; Carvalho et al., 2010). Os resultados demonstraram que variações na qualidade seminal identificadas por diferentes técnicas laboratoriais explicaram parte da variação da fertilidade nos sistemas de produção *in vitro* de embriões. Assim, de acordo com os modelos obtidos, diferentes conjuntos de variáveis associadas à estrutura da membrana plasmática e função espermática podem ser usados no sentido de identificar variações intrínsecas às taxas de clivagem e ao desenvolvimento embrionário. Isso reforça as observações de que a análise individual de uma variável, pelo menos nos sistemas *in vitro*, não tem relevância no estudo das relações entre parâmetros seminais e fertilidade. Por outro lado, diferentes aspectos



de uma mesma população espermática podem interagir entre si, alterando a dinâmica da avaliação seminal (Amann e Hammerstedt, 1993).

No ensaio proposto, as taxas de clivagem e de blastocistos apresentaram associações diferentes para os atributos seminais testados. Ainda, a análise do tipo *backward* produziu modelos distintos, com variações no conjunto dos atributos testados, resultando em menor acuidade para a taxa de clivagem ($R^2 = 0,21$ e $0,23$ para os modelos 1 e 2, respectivamente). Essa diferença pode ser devido à natureza do teste empregado, uma vez que a presença de células com membranas íntegras e que sofreram capacitação (reação acrossomal verdadeira) podem garantir a penetração ovocitária, mas não as subsequentes fases de formação do pró-núcleo, singamia e primeiras divisões mitóticas. Contudo, é bem possível que essa mesma subpopulação espermática apresente estrutura cromatínica e DNA íntegros, permitindo maiores índices de desenvolvimento embrionário (Fernandes et al., 2008). Portanto, os resultados dos modelos sugerem que as taxas de blastocistos são mais fidedignas às variações dos atributos seminais testados em comparação às taxas de clivagem. Mesmo assim, a integridade das membranas avaliada pelos diferentes métodos, em conjunto com as colorações vitais, mostraram-se uma ferramenta útil na estimativa da variação da fertilidade, embora muitos aspectos ainda sejam contraditórios (Januskauskas et al., 1999; Tanghe et al., 2002; Brito et al., 2003; Tartaglione e Ritta, 2004; Carvalho et al., 2010).

É interessante ressaltar que estudo recente, em que foi usada inferência bayesiana para correlacionar resultados de fertilidade *in vitro* e *in vivo*, mostrou que as taxas de formação do pró-núcleo e de blastocisto não diferiram entre touros, embora o mesmo resultado não tenha sido observado para a taxa de clivagem. Além disso, verificou-se que as taxas de concepção estimada e real, obtida em um programa de inseminação artificial em tempo fixo, foram muito similares quando as taxas de clivagem e de blastocistos foram consideradas em combinação ou usadas isoladamente (Sudano et al., 2011). Desta forma, os autores constataram que tanto a taxa de clivagem como a de blastocistos são úteis na estimativa da fertilidade *in vivo*. Por outro lado, Al Naïb et al. (2011) concluíram que touros de alta fertilidade têm maior capacidade de fertilizar ovócitos *in vitro*, mas, uma vez fertilizados, seu desenvolvimento posterior independe do *status* de fertilidade do touro.

A reação acrossomal verdadeira foi observada em todos os modelos estimados, sendo um indicador consagrado na análise do sêmen congelado (Feliciano Silva, 1998). Sua característica principal reside na preservação das glicoproteínas ligadas à membrana plasmática dos espermatozoides, dando início ao processo de fecundação (Bellin et al., 1998). Quando lesada, a membrana acrossomal facilita a penetração de corantes que permitem a identificação e a mensuração da proporção de espermatozoides afetados. Neste sentido, os métodos de coloração baseados no FITC-PNA/IP e *trypan blue*/Giemsa favoreceram uma estimativa confiável da proporção de espermatozoides vivos e com acrossomo estruturalmente íntegro, além de terem sido de fácil aplicabilidade mediante critérios bem definidos quanto à identificação visual.

Embora o sêmen tenha importância fundamental no processo de fecundação, a competência do ovócito é um ponto crítico na produção *in vitro* de embriões, contribuindo para a qualidade embrionária (Lonergan et al., 2008). Fatores que interferem no desenvolvimento da competência do ovócito, como tamanho do foliculo (Machatkova et al., 2004), grau de atresia (Hendriksen et al., 2000), fase de dominância (Hagemann et al., 1999), estresse pelo calor (Ju et al., 2005), morfologia do complexo do *cumulus oophorus* (Boni et al., 2002), são difíceis de serem controlados experimentalmente e ainda constituem obstáculos a serem superados para aumentar a eficácia nos sistemas comerciais de produção *in vitro* de embriões. Além disso, a raça das doadoras de ovócitos tem se mostrado um fator importante no que se refere à fertilidade, e resultados de pesquisa relatam seu efeito sobre a taxa de fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial, sendo obtida uma taxa de blastocistos superior para raças de corte quando comparadas às de leite (Abraham et al., 2012).

Conclusão

A seleção espermática em gradiente de *Percoll*[®] foi eficaz na obtenção de uma maior população de células móveis e com membranas plasmática e acrossomal intactas. O conjunto de variáveis que melhor explicou as variações na fertilidade *in vitro* foram vigor, células vivas, mortas e com reação verdadeira do acrossomo para a técnica do FITC-PNA/IP, porcentagem de vivos, reação acrossomal verdadeira e falsa para *trypan blue*/Giemsa e a categoria de vivos para eosina/nigrosina. Em conclusão, a eficiência da produção *in vitro* de embriões foi intimamente relacionada com as características das células espermáticas. Portanto, na avaliação de rotina do sêmen, a inclusão de testes para avaliar a integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal seria muito útil para prever a capacidade fecundante dos touros, particularmente antes da sua utilização em programas de reprodução assistida.

Agradecimentos

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida, e à Embriza Biotecnologia de Embriões, pela cessão do material biológico, dos resultados e do apoio durante a realização deste trabalho.



Referências

- Abraham MC, Gustafsson H, Ruete A, Brandt YCB.** Breed influences on *in vitro* development of abattoir-derived bovine oocytes. *Acta Vet Scand*, v.54, p.36, 2012. doi:10.1186/1751-0147-54-36.
- Al Naib A, Hanrahan JP, Lonergan P, Fair S.** In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. *Theriogenology*, v.76, p.161-167, 2011.
- Amann RP.** Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl*, v.10, p.89-98, 1989.
- Amann RP, Hammerstedt RH.** Detection of differences in fertility. *J Androl*, v.23, p.17-25, 2002.
- Amann RP, Hammerstedt RH.** In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl*, v.14, p.397-406, 1993.
- Anzar M, Graham EF.** Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen. *Theriogenology*, v.45, p.13-20, 1996.
- Barth AD, Oko RJ.** Preparation of semen for morphological evaluation. In: Barth AD, Oko RJ. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames, IA: Iowa State University Press, 1989. p.8-18.
- Bellin ME, Oyarzo JN, Hawkins HE, Zhang H, Smith RG, Forrest DW, Sprott LR, Ax RL.** Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J Anim Sci*, v.76, p.2032-2039, 1998.
- Boni R, Cuomo A, Tosti E.** Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biol Reprod*, v.66, p.836-842, 2002.
- Brito FC, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP.** Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. *Theriogenology*, v.60, p.1539-1551, 2003.
- Carvalho JO, Sartori R, Machado GM, Mourão GB, Dode MAN.** Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, v.74, p.1521-1530, 2010.
- Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Fornés MW, Alberio RH.** Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production *in vitro*. *Theriogenology*, v.66, p.1185-1193, 2006.
- De Jonge CJ.** Attributes of fertile spermatozoa-an update. *J Androl*, v.20, p.463-473, 1999.
- Den Daas JHG.** Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim Reprod Sci*, v.28, p.87-94, 1992.
- Didion BA, Dorbinski JR, Giles JR, Graves CN.** Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res*, v.22, p.51-57, 1989.
- Dode MA, Rodovalho NC, Ueno VG, Fernandes CE.** The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.69, p.15-23, 2002.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK.** Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detection sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*, v.23, p.25-43, 2002.
- Feliciano Silva AED.** Reação acrossomática induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 38p. (Documentos, 35).
- Fernandes CE, Dode MAN, Pereira D, Silva AEDF.** Effects of scrotal insulation in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with *in vitro* fertilizing ability. *Theriogenology*, v.70, p.1560-1568, 2008.
- Flesch FM, Gadella BM.** Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*, v.1469, p.197-235, 2000.
- Hagemann LJ.** Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology*, v.51, p.449-459, 1999.
- Hendriksen PJM, Vos PLAM, Steenweg WNM, Bevers MM, Dieleman SJ.** Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology*, v.53, p.11-20, 2000.
- Holt WV.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.3-22, 2000.
- Januskauskas A, Gil J, Söderquist L, Haard MGM, Haard MC, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H.** Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, v.52, p.641-658, 1999.
- Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE, Yang X.** Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.64, p.1677-1689, 2005.
- Lonergan P, Fair T.** *In vitro* produced bovine embryos - Dealing with the warts. *Theriogenology*, v.69, p.17-22, 2008.
- Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M.** Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, v.61, p.329-335, 2004.
- Mehmood A, Anwar M, Saqlan Naqvi SM.** Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. *Anim Reprod Sci*, v.111, p.141-148, 2009.



- Mendes JOB Jr, Burns PD, De La Torre-Sanchez JF, Seidel GE Jr.** Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology*, v.60, p.331-340, 2003.
- Muller CH.** Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests. *J Androl*, v.21, p.10-30, 2000.
- Nagy S, Jansen J, Topper E K, Gadella BM.** A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrossome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod*, v.68, p.1828-1835, 2003.
- Oshio S.** Apparent densities of spermatozoa of various mammalian species. *Gamete Res*, v.20, p.159-164, 1998.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL.** Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, v.44, p.859-869, 1995.
- Pertoft H.** Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J Biochem Biophys Methods*, v.44, p.1-30, 2000.
- Sailer BL, Jost LK, Evenson DP.** Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry*, v.24, p.167-173, 1996.
- Samardzija M, Karadjole M, Matkovic M, Cergolj M, Getz I, Dobranic T, Tomaskovic A, Petric J, Surina J, Grizelj J, Karadjole T.** A comparison of BoviPure[®] and Percoll[®] on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.237-247, 2006.
- Sattar A, Rubessa M, Di Francesco S, Longobardi V, Di Palo R, Zicarelli L, Campanile G, Gasparrini B.** The influence of gamete co-incubation length on the *in vitro* fertility and sex ratio of bovine bulls with different penetration speed. *Reprod Domest Anim*, v.46, p.1090-1097, 2011.
- Somfai T, Bodó S, Nagy S, Papp AB, Iváncsics J, Baranyai B, Gócza E, Kovács A.** Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrossome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, v.37, p.285-290, 2002.
- Stringfellow DA, Seidel SM.** Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3.ed. [s.l.]: SBTE, 1999. 180p.
- Sudano MJ, Crespilho AM, Fernandes CB, Martins Junior A, Papa FO, Rodrigues J, Machado R, Landin-Alvarenga F.** Use of bayesian inference to correlate *in vitro* embryo production and *in vivo* fertility in zebu bulls. *Vet Med Int*, v.2011, p.436381, 2011. doi: 10.4061/2011/436381.
- Talbot P, Chacon RS.** A triple-stain technique for evaluating normal acrossome reactions of human sperm. *J Exp Zool*, v.215, p.201-208, 1981.
- Tanghe S, Van Soom A, Sterckx V, Maes D, Kruif A.** Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. *Reprod Domest Anim*, v.37, p.127-132, 2002.
- Tartaglione CM, Ritta MN.** Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.62, p.1245-1252, 2004.
- Watson PF.** Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.871-891, 1995.
- Yanagimachi R.** Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J (Ed.). *The physiology of reproduction*. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. p.189-317.
- Zúccari CESN, Carrijo PR, Leite PA, Scaldelai PRR, Rodovalho NCM, Zanenga CA, Kiefer C, Costa e Silva EV.** Efeito da seleção em gradiente de Percoll[®] sobre parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, v.9, p.358-366, 2008.
- Zúccari CESN, Leite PA, Passos TS, Carrijo PR, Kiefer C.** Correlação entre métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozoide bovino criopreservado. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, v.10, p.678-684, 2009.
-