

## NOVOS ENFOQUES NA AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA DE BOVINOS E SUA CONTRIBUIÇÃO NO MELHORAMENTO GENÉTICO DO REBANHO

*(New focuses on andrological evaluation of cattle and its contribution in the genetic improvement of the flock)*

José Adalmir Torres de SOUZA<sup>1\*</sup>; Ney Rômulo de Oliveira PAULA<sup>1</sup>; Sérgio Henrique COSTA JÚNIOR<sup>2</sup>; Wallisson Bruno de Morais PACHECO<sup>3</sup>

<sup>1\*</sup>Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina/PI; <sup>2</sup>Hospital Veterinário Universitário (UFPI);

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (UFPI). \*E-mail: [adalmir@ufpi.edu.br](mailto:adalmir@ufpi.edu.br)

### RESUMO

O processo de fertilização é resultante de diversos mecanismos funcionais e estruturais do espermatozoide. Na andrologia veterinária, no que se refere à avaliação do potencial *coeundi* e *generandi*, estão disponíveis diversos testes laboratoriais e de imagem que servem como ferramenta de seleção de touros para a reprodução durante a estação de monta. Estas metodologias auxiliam nos protocolos de criopreservação espermática, na investigação de melhores crioprotetores e diluidores para uso *in vivo* ou *in vitro*. No entanto, são poucas utilizadas na rotina diária a campo e restritos aos centros de pesquisa. A presente revisão de literatura objetiva descrever as metodologias que estimam o potencial fecundante do sêmen criopreservado do touro.

**Palavras-chave:** Andrologia; biotecnologia; bovinos

### ABSTRACT

The fertilization process is the result of several functional and structural mechanisms of the sperm. In veterinary andrology, with regard to the evaluation of the *coeundi* and *generandi* potential, several laboratory and image tests are available that serve as a tool for selecting bulls for breeding during the breeding season. These methodologies assist in sperm cryopreservation protocols, in the investigation of better cryoprotectants and extenders for use *in vivo* or *in vitro*. However, they are few used in the daily routine in the field and restricted to research centers. The present literature review aims to describe the methodologies that estimate the fertile potential of the bulls cryopreserved semen.

**Key words:** Andrology; biotechnology; cattle

### INTRODUÇÃO

A predição da capacidade reprodutiva dos machos nos sistemas de criação brasileiro pode ser avaliada a partir de diversas metodologias aplicáveis ao sêmen. Dessa forma, o prolongamento do período útil do ejaculado consolidou a principal biotécnica reprodutiva aplicada ao reprodutor, a criopreservação. Favorecendo, então, o melhoramento genético do rebanho com resultados exponenciais na pecuária brasileira.

Na rotina de campo, o exame andrológico baseia-se na mensuração da motilidade, vigor, turbilhonamento, concentração e morfologia espermática (CBRA, 2013). Vários grupos de pesquisa vêm executando estudos sobre a competência espermática e estabelecer correlações destes testes com as taxas de fertilidade *in vivo* em diferentes raças (FREITAS-DELL'AQUA *et al.*, 2009), sendo a inseminação artificial e a fertilização *in vitro* os testes que proporcionam maior sensibilidade do potencial fertilizante do sêmen. Entretanto, outras metodologias são aplicáveis à mensuração ultraestrutural espermática e exames de imagem contribuem na emissão do laudo final do touro sob avaliação.

A presente revisão de literatura objetiva descrever as metodologias que estimam o potencial fecundante do sêmen criopreservado do touro.

## AVALIAÇÃO CLÍNICA

### Anamnese

A anamnese é o primeiro passo para o médico veterinário poder caracterizar o animal, por possuir função auxiliar no diagnóstico através dos registros associados ao mesmo, seja o estado sanitário e nutricional, a raça, período de acasalamento, patologias e tratamentos anteriores, abortos, utilização de biotécnicas reprodutivas, índice de natalidade, desmama e condições edafoclimáticas. O primeiro passo após a anamnese é a identificação do animal por meio de tatuagens, brincos, registros em associações da raça, número a fogo e outros (MENEGASSI e BARCELLOS, 2015).

### Exame clínico geral

Com o objetivo de avaliar andrologicamente um touro, deve-se obter informações sobre o estado de saúde antes do exame, tais como idade/nascimento, vacinação, afecções e tratamentos, frequências de acasalamentos, bem como outras informações pertinentes (MENEGASSI e BARCELOS, 2015). No exame físico podem ser observadas alterações nos membros e cascos as quais podem diminuir a frequência de coberturas e taxas de concepção, lesões prepúciais, penianas e testiculares, tornando o animal subfêtil.

### Exame clínico específico

No exame dos componentes do sistema genital, a inspeção e palpação da bolsa escrotal revelam ocorrências de lesões, hérnias, ectoparasitas, dermatites, aumento da sensibilidade e mobilidade (VALE FILHO, 1997).

Na avaliação dos testículos, a consistência reflete a funcionalidade ou efeitos patológicos do parênquima testicular. Numa escala de pontos proposta pelo CBRA (2013) que varia de 1 a 5, o diagnóstico de tensão superficial e elasticidade corroboram numa espermatogênese normal (VALE FILHO, 1997; GARCIA, 2017). A mensuração testicular possui relação com a fertilidade e precocidade, segundo SILVA *et al.* (2002) a circunferência escrotal é o parâmetro mais aproveitado para eleição de reprodutores, devido à facilidade na mensuração e a afinidade com os parâmetros espermáticos notados. A avaliação do epidídimo, através da palpação e métodos de imagem, pode identificar hipoplasias, aplasias, inflamações e consistência, associadas ou não às afecções testiculares (CBRA, 2013).

Em relação ao pênis, qualquer lesão no pênis pode dificultar a capacidade de monta, por isso no exame verifica-se o tamanho, mobilidade, mucosa, secreções e presença de anormalidades (HAFEZ e HAFEZ, 2004). O pênis é avaliado por meio da inspeção e palpação, onde o melhor momento para se observar as patologias penianas é durante o exame de libido (MENEGASSI e BARCELOS, 2015), recomenda-se examinar o pênis após a ereção com o eletroejaculador durante a colheita de sêmen (CBRA, 2013).

O prepúcio deve ser avaliado quanto ao seu tamanho, forma, integridade do óstio, presença de parafimose, fimose e postite, além da análise ambiental, visto que pastagens mal

manejadas contendo plantas invasoras e sujidades podem ocasionar abscessos, principalmente animais que possuem o prepúcio penduloso e que vivem em manejo extensivo (RABELO e SILVA, 2011).

A ultrassonografia é uma técnica não invasiva que permite o exame do trato reprodutor dos machos sem risco à integridade testicular e glândulas anexas. Através desse método é possível visualizar o parênquima testicular e correlacionar sua ecogenicidade com a produção espermática (MENEGASSI e BARCELOS, 2015; SOUSA *et al.*, 2020).

Animais pré-púberes apresentam baixa ecogenicidade testicular, ocorrendo um aumento durante a maturação sexual, coincidindo com a puberdade (CHANDOLIA *et al.*, 1997). Embora ocorra esta transição no parênquima sob avaliação ultrassonográfica, para BRITO *et al.* (2004) o perímetro escrotal ainda é o melhor indicador de precocidade apresentando correlação positiva em relação à ecogenicidade (CARDILLI *et al.*, 2013; PASTORE *et al.*, 2015).

O estudo das alterações reprodutivas através da ultrassonografia em touros pode oferecer aos profissionais de campo uma valiosa ferramenta de auxílio diagnóstico. Várias patologias podem ser diagnosticadas, como orquite, mineralização, abscessos, epididimite, varicocele, entre outros. A presença de pequenos focos hiperecoicos no parênquima testicular pode ser resultado de áreas de calcificação, fibrose ou degeneração dos túbulos seminíferos (MENEGASSI e BARCELOS, 2015).

Em casos de orquite, as características ultrassonográficas variam conforme o estágio da afecção. Quando a fase aguda está presente observa-se um aumento testicular no corte transversal, com ecotextura heterogênea, padrão hipoeicoico difuso devido ao edema tecidual (BALARO *et al.*, 2019), presença ou não de fluidos entre a túnica e o testículo.

No US, a degeneração testicular ocasiona perda da integridade e arquitetura testicular e sequencialmente uma diminuição no tamanho do órgão. Forma-se um padrão heterogêneo hipereicoico com o transcorrer da doença, percebendo pontos hipereicoicos de mineralização (BALARO *et al.*, 2019).

A hipoplasia testicular parcial ou total, uni ou bilateral possui caráter congênito, sob ultrassonografia, o testículo hipoplásico é identificado como atrófico, hipoeicoico e de ecotextura homogênea a heterogênea (Vital *et al.*, 2007).

A imagem ultrassonográfica tem contribuído no diagnóstico precoce de enfermidades das glândulas sexuais acessórias quando empregada de forma complementar, melhorando a acurácia de seleção de touros com melhor eficiência reprodutiva.

A termografia por infravermelho, outra técnica de grande importância no julgamento de reprodutores, tem por princípio a energia eletromagnética irradiada pelos corpos (TAN *et al.*, 2009). É um método não invasivo, indolor e não emite radiação ionizante, é utilizado na andrologia animal com acurácia para avaliar estresse térmico frente aos padrões da temperatura escrotal que podem definir um animal como apto ou inapto ao papel de reprodutor. Em homeostase, a temperatura escrotal de um touro apresenta-se 4 a 6°C mais baixa que a temperatura abdominal. Escrotos com alguma alteração no sistema termorregulador demonstram uma coloração assimétrica com pontos dispersos de temperatura quente ou fria ou coloração homogênea constituindo em pequenos gradientes de temperatura (MENEGASSI e BARCELLOS, 2015).

O teste de libido é uma técnica que deve utilizado para a avaliação do comportamento sexual dos touros, bem como da habilidade física do animal, também chamada de capacidade de monta, um fator de extrema importância na seleção de reprodutores de raças zebuínas (PINEDA *et al.*, 1997) e raças europeias (CHENOWETH, 1981).

## AVALIAÇÃO SEMINAL

### Métodos de coleta de sêmen

Para a coleta de sêmen, três métodos são aplicáveis em bovinos: vagina artificial, do eletroejaculador e a massagem das glândulas sexuais acessórias.

O uso da vagina artificial constitui o método preferencial para a coleta, simulando as condições durante a monta natural com obtenção de amostras seminais mais fidedignas. No entanto, preconiza-se o treinamento prévio dos touros para que não o tornem refratários à técnica (CHENOWETH *et al.*, 1994; MENEGASSI e BARCELOS, 2015).

Na eletroejaculação, a partir dos estímulos elétricos para obtenção do ejaculado, o macho deverá expor o pênis, ter ereção e ejacular (HAFEZ e HAFEZ, 2004). No entanto, a principal desvantagem do uso de eletroejaculador refere-se à reação do touro, sob estímulo elétrico respondendo com intensa contração muscular, vocalização e desconforto evidente (MENEGASSI e BARCELOS, 2015).

Por via retal, a massagem das glândulas sexuais acessórias vem sendo aplicadas em touros mantidos sob criação extensiva. De acordo com MENEGASSI e BARCELOS (2015), a amostra não é eleita para criopreservação, pois há diluição excessiva com plasma, contaminação por urina e redução da libido (PALMER *et al.*, 2005).

Independentemente do método de coleta executado, o sêmen coletado deve ser levado imediatamente para o laboratório e imerso em banho-maria, para que se proceda a sua avaliação seguindo critérios estabelecidos pelo CBRA (2013).

### Avaliação macroscópica do sêmen

Vários parâmetros de avaliação macroscópica são utilizados no sentido de predizer a real fertilidade do reprodutor, dentre eles destaca-se o volume, aspecto, cor, odor e pH do sêmen.

**Volume seminal:** deve ser apreciado imediatamente após a coleta, apresentando variação entre 1-14mL. A técnica da vagina artificial obtém volumes próximos à monta natural em relação aos demais métodos, porém pode oscilar em função da espécie, descanso sexual e a libido (MORANI *et al.*, 2018).

**Aspecto:** a classificação do aspecto baseia-se na cor e aparência do sêmen, podendo ser esbranquiçada, branca, marfim ou amarelada e cremosa, leitosa, opalescente, serosa ou aquosa, respectivamente. Esta avaliação reflete diretamente na concentração espermática e presença de anormalidades, como pus, urina, sangue, plasma seminal e demais sujidades. O aspecto seminal está diretamente ligada à concentração espermática e poderá se apresentar com aparência, leitosa, cremosa, serosa ou aquosa (CBRA, 2013).

**Cor:** o sêmen pode apresentar colorações diferentes, características de cada espécie ou devido a alterações como, presença de sangue, pus, urina, células epiteliais, sujidades e etc., podendo apresentar-se com coloração branca, acinzentada, marfim ou amarelo citrino (CBRA, 2013).

**Odor:** deve ser *sui generis*, porém pode ser indicativo também de contaminantes, como urina e germes determinantes de putrefação.

**pH:** a determinação do pH não é comum durante o exame andrológico, mas fornece informações importantes a partir de alterações no pH normal do sêmen que é próximo da neutralidade. Valores tendendo à acidez indicam processos infecciosos, enquanto a tendência à alcalinidade indica presença de urina na amostra (MORANI *et al.*, 2018).

### **Avaliação microscópica do sêmen**

Microscopicamente, os parâmetros seminais a serem avaliados, são bem mais precisos quanto à eficiência no julgamento do sêmen e, naturalmente, do reprodutor. São eles: turbilhonamento, motilidade (total e individual progressivo), vigor, concentração e morfologia espermática.

**Turbilhonamento:** também chamado movimento em massa, o turbilhonamento é avaliado com objetiva de 10x a 20x e classificação desse movimento (1 a 5) é resultante da combinação da motilidade, vigor e concentração espermática. Esta avaliação somente é válida para sêmen de ruminantes, podendo o sêmen ser afetada por fatores extrínsecos, como o método de coleta e a temperatura no momento da mesma, sendo que a melhor visualização dá-se a partir da borda da gota seminal sobre a lâmina de microscopia (CBRA, 2013).

**Motilidade:** a motilidade é classificada pela porcentagem de espermatozoides móveis no campo microscópico, esta avaliação consiste em um dos critérios mais populares usados na rotina de campo. A visualização correta se dá a partir de uma gota de sêmen sobre lâmina e coberta por lamínula previamente aquecidas e mantidas a 37°C (MENEGASSI e BARCELOS, 2015).

**Vigor:** é denominado como o movimento progressivo espermático, consiste na velocidade que os gametas atravessam o campo óptico do microscópio. É classificado subjetivamente de 0 a 5, sendo 0 a ausência de movimento progressivo e 5 representando um movimento vigoroso. É uma avaliação complementar à motilidade e representam, juntas, indicadores quantitativos e qualitativos do sêmen (MORANI *et al.*, 2018).

**Concentração:** dentre as análises mediatas do sêmen, avalia-se a concentração espermática pela determinação de células por unidade de volume, em mm<sup>3</sup>. A concentração pode ser determinada através de três métodos: espectrofotometria, espermioidensimetria e contagem em câmara de Neubauer, sendo este último método o mais utilizado em condições de campo (CBRA, 2013). Quando o objetivo for criopreservação, é indispensável a quantificação para determinação do número de doses a partir do ejaculado.

**Morfologia:** apresenta melhor correlação com a fertilidade, já em altas frequências de defeitos espermáticos apresentam menor fertilidade em decorrências de anormalidades na fase de

maturação e na integridade do epitélio seminífero (ARRUDA *et al.*, 2015) e são usados para desqualificar determinado macho para uso como reprodutor.

De acordo com o CBRA (2013), os defeitos podem ser classificados em defeitos maiores e menores visualizados sob microscopia óptica, contraste de fase ou contraste de fase diferencial (DIC), a partir de esfregaços corados ou lâminas em preparação úmida, estas técnicas precisam ser mencionadas no laudo andrológico (ARRUDA *et al.*, 2011).

### **Criopreservação do sêmen**

Desde a primeira referência sobre criopreservação das células espermáticas bovinas (POLGE, 1949), muitas pesquisas têm sido realizadas para determinar taxas de resfriamento, taxas de congelamento, métodos de adição do crioprotetores e diluentes, sempre motivadas pelo anseio de determinar a técnica mais apropriada para a preservação das células espermáticas de cada uma das espécies estudadas.

Esta biotécnica serve como banco de reserva genética de animais geneticamente valorizados, proporciona intercâmbio genético e seleciona touros quanto à fertilidade (SILVA *et al.*, 2011) gerando grande impacto na bovinocultura, conforme dados da ASBIA (2019), os quais registram que em 2018 foram comercializados 15,4 milhões de doses de sêmen.

Durante o processo de criopreservação, ocorre uma diminuição na viabilidade espermática devido a várias alterações estruturais e bioquímicas (YOSHIDA, 2000), e, conseqüentemente, redução do número e qualidade dos espermatozoides (WATSON, 2000).

No sêmen ainda são observados efeitos deletérios sobre o potencial de fertilização em decorrência do processo de criopreservação. De acordo com CELEGHINI *et al.* (2008) há um decréscimo em, aproximadamente, 50% da motilidade espermática e quando analisada a integridade da membrana plasmática, esta queda pode ser mais acentuada (>60%).

Diluentes utilizados para preservação seminal devem conter ingredientes básicos e aditivos que possibilitam a proteção dos espermatozoides, tais como substratos energéticos, tampões e componentes contra danos criogênicos, permitindo a sobrevivência dessas células durante a diluição, o resfriamento e a criopreservação, além de uma melhor qualidade espermática após a descongelamento.

Todas as células possuem mecanismos de oxidação-redução, também chamado de reações redox, tais reações são essenciais para diversos processos bioquímicos da célula, tais como metabolismo energético, sinalização e defesa celular (BUETTNER, 1993). Antioxidantes, são substâncias que mesmo em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, tem capacidade de proteger as células de danos oxidativos (HALLIWELL, 1991).

O papel principal de um antioxidante é permitir que os compostos oxidativos exerçam suas funções fisiológicas normais ao mesmo tempo que impede danos irreparáveis as células e modificação da estrutura e função celular, visto que a nível de sêmen quaisquer fatores externos alteram a homeostase do microambiente espermático (WATSON, 2000).

Segundo o CBRA (2013), características mínimas deverão ser respeitadas ao uso do sêmen fresco, refrigerado e congelado, a análise da estrutura e função espermáticas são importantes visto que algumas partidas apresentam resultados satisfatórios na triagem, mas quando usadas *in vivo* mostram uma redução do potencial de fertilização (CELEGHINI *et al.*, 2017).

### **Avaliação do sêmen pós-criopreservação**

Após a finalização do processo de criopreservação, o sêmen precisa ser descongelado para avaliações espermáticas (motilidade, vigor, morfometria, termorresistência, etc) como controle de qualidade da partida, possibilitando a comparação dos aspectos microscópicos obtidos, com os valores determinados no momento da coleta, referenciados no item avaliação microscópica do sêmen, na pré-criopreservação. De acordo com a CBRA (2013), o sêmen deve ser descongelado durante 30 segundos a 37 °C.

**Motilidade e vigor:** a motilidade e vigor espermático devem ser avaliados imediatamente após a descongelação, utilizando lâmina e lamínula previamente aquecidas, em microscopia convencional.

**Morfologia espermática:** pode-se realizar o esfregaço convencional para coloração podendo ser analisado posteriormente, ou o preparo da câmara úmida para ser avaliada de imediato, sob microscopia de contraste de fase.

**Teste de termorresistência (TTR):** trata-se de outra técnica que possibilita a verificação da resistência espermática, sob incubação, através da motilidade do sêmen fresco ou descongelado, representando correlação positiva com a fertilidade. São aplicáveis o TTR rápido e TTR lento, a 37 °C durante 5 horas e a 45 °C durante 30 minutos, respectivamente (BORGES-SILVA *et al.*, 2015).

**Teste Hiposmótico:** avalia a integridade da membrana plasmática a partir da incubação dos espermatozoides numa solução hiposmótica, ocorrendo influxo de água até que seja atingido o equilíbrio osmótico. Em decorrência deste processo, a membrana se expande e provoca enrolamento da cauda, porém, se estiver danificada, esta reação não ocorrerá (JEYDENDRAN *et al.*, 1984).

**Morfometria:** a morfometria espermática também pode ser mensurada por sistema computadorizado, como o ASMA (Automated Sperm Morphometry Analyses), através de lâminas coradas. As avaliações da cabeça espermática são avaliadas pelo Metrix, ambas aplicáveis em ruminantes (ARRUDA *et al.*, 2011).

**Cinética espermática:** o sistema *Computer Assisted Sperm Analyses* (CASA) é um tipo de microscopia ótica de contraste de fase, capaz de identificar os distintos movimentos expressados pelas células espermáticas. Por esse sistema é possível obter informações mais precisas do movimento de cada célula (AMANN e KARTZ, 2004), comparativamente às obtidas pela avaliação convencional.

A análise convencional, feita em microscopia óptica através da observação de uma gota seminal colocada sob lamínula, limita-se a analisar o percentual de espermatozoides móveis. Já através da análise espermática assistida por computador (CASA) é possível avaliar qualitativamente a cinética espermática (MORANI *et al.*, 2018) sob diferentes aspectos. Dentre os móveis, o software permite caracterizar a cinética nas em diferentes variáveis, como por exemplo: velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Estas variações da cinética

geradas pelo CASA demonstram correlação satisfatória com a fertilidade do touro (FARREL *et al.*, 1996).

**Sondas fluorescentes:** as técnicas associadas a *sondas fluorescentes*, por sua característica de marcar estruturas específicas das células e de detectar integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara (CELEGHINI, 2005), estimam com boa precisão o real potencial espermático.

A membrana espermática é uma estrutura especializada que exerce função primordial na fecundação, cuja integridade é essencial à viabilidade seminal (MORANI *et al.*, 2018).

Para avaliação da *integridade da membrana plasmática*, várias sondas são utilizadas por mostrarem afinidade ao DNA, o diacetato de 6-carboxifluoresceína (DIC) é um corante muito utilizado que tem a propriedade de penetrar na membrana plasmática. Enzimas presentes no citoplasma espermático convertem a moléculas de DIC em fluoresceína a qual emite uma cor verde. A conversão do DIC em fluoresceína ocorre se a membrana plasmática da célula estiver íntegra, pois a membrana plasmática lesada não possibilita permeabilidade a este corante.

O iodeto de propídio (IP) tem afinidade com receptores localizados no DNA. Trata-se de um corante impenetrável à membrana plasmática, porém quando esta apresenta alguma falha, a molécula de IP consegue penetrar na célula e se ligar ao DNA, emitindo uma fluorescência vermelha (ARRUDA *et al.*, 2011; BERGSTEIN *et al.*, 2014).

Com o objetivo de avaliar a *integridade do acrossoma*, SILVA e GADELLA (2006) revisaram essa temática e destacaram que as lectinas podem ser utilizadas, uma vez que são capazes de ligar-se a carboidratos existentes nas glicoproteínas da membrana acrossomal. Substâncias geralmente derivadas da ervilha da espécie *Pisum sativum* (PSA) e do amendoim da espécie *Arachis hypogaea* (PNA), assim como a Concanavalina A (ConA), uma lectina D-glucose/D-manose extraída de sementes da forrageira *Canavalia ensiformis*, são associadas à fluoróforos, para permitir sua visualização ao microscópio de imunofluorescência, sendo mais utilizado o Isocianato de Fluoresceína (FITC).

O potencial mitocondrial tem uma forte correlação com o potencial energético da célula e com a motilidade (TSAKMAKIDIS *et al.*, 2010), correlacionando-se com a fertilidade. A utilização de sondas fluorescentes na predição do potencial mitocondrial é considerada uma técnica viável de avaliação do sêmen.

GARNER *et al.* (1997) testaram à ação dos fluoróforos Rodamina 123 (R123), JC-1 e MitoTracker™ (MITO) para avaliar a função mitocondrial da célula espermática de bovinos e identificaram que a sonda JC-1 foi eficaz na classificação do potencial da membrana mitocondrial.

Ainda que espermatozoides afetados por danos no DNA possam ser denominados normais nos testes de motilidade e integridade de membrana, podem levar a falhas no desenvolvimento embrionário (VARNER *et al.*, 2008; TSAKMAKIDIS *et al.*, 2010).

Sondas fluorescentes têm sido aprimoradas com essa finalidade, como, por exemplo, a utilização da técnica COMET (Cometa), que apesar de ser uma técnica simples, rápida e de baixo custo tem a capacidade de detectar e avaliar lesões pré-mutagênicas (ERDTMANN, 2003), através da lise de membranas celulares seguida de uma indução da migração eletroforética do DNA, liberando a matriz em agarose, adquirindo então, quando vista ao

microscópio, a forma aparente de um cometa com cabeça, região nuclear, e cauda, a qual contém os fragmentos ou fitas de DNA que migram na direção do ânodo (BRIANEZI *et al.*, 2009).

A técnica de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay) atua na adição de nucleotídeos modificados e marcados com moléculas fluorescentes às fitas simples ou duplas fragmentadas, a partir da adição da enzima TdT (terminal deoxynucleotidil transferase) (ALVES *et al.*, 2015). O TUNEL identifica as células em morte celular, esta função é imprescindível na avaliação do sêmen, correlacionando negativamente com a fertilidade (WALTERS *et al.*, 2004). A avaliação do DNA espermático, quando comparado a outras técnicas, mostra-se superior à técnica do laranja de acridina na detecção de fragmentação de DNA de espermatozoides de touros (MARTINS *et al.*, 2005).

A técnica laranja de acridina pode ser utilizada sob microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. Se o DNA espermático apresentar fragmentação, a sonda liga-se aos grupos fosfatos das fitas simples e emite a fluorescência vermelha, quando há integridade do DNA, a laranja de acridina se intercala entre os ácidos nucleicos e emite a fluorescência verde (TEJADA *et al.*, 1984).

### Testes de fertilidade

Objetivando efetivamente garantir a fertilidade dos reprodutores, os espermatozoides devem ser avaliados, pela fertilização *in vitro* (FIV) e/ou pela técnica de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), esta última sendo mais desvantajosa devido ao período final de avaliação (MENEGASSI e BARCELOS, 2015). Cabe ressaltar também as distintas técnicas que possibilitam utilizar o sêmen sexado, direcionando os nascimentos no rebanho de forma a atender as necessidades de acordo com a cadeia produtiva.

O não cumprimento dos critérios para sêmen criopreservado poderá alterar a taxa de concepção de todo um lote, assim como prejuízo financeiro na aquisição de hormônios para IATF, TETF e no processo de criopreservação seminal.

## CONCLUSÕES

A célula espermática possui complexos mecanismos para que se ocorra a fertilização, avaliações tradicionais durante o exame andrológico geralmente não são eficazes na predição no papel de reprodutor do macho. A aplicabilidade dos testes que avaliam as estruturas espermáticas permite análises mais fidedignas garantindo qualidade seminal superior. No entanto, mais investigações devem ser realizadas para que haja uma padronização buscando alta correlação com a fertilidade em touros de alto valor zootécnico.

## REFERÊNCIAS

ALVES, M.B.R.; OLIVEIRA, M.L.; LANÇONI, R.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S.A.; CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. Investigando a fragmentação não induzida e a susceptibilidade à fragmentação do DNA espermático: refinamento da avaliação espermática. Parte 2. Revista Brasileira Reprodução Animal, v.39, n.3, p.309-314, 2015.

AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. *Journal Andrology*, v.25, n.3, p.317-325, 2004.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTON. J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.2, p.145-151, 2011.

ARRUDA, R.P.; CELEGRINI, E.C.C.; GARCIA, A. R.; SANTOS, G.C.; LEITE, T.G.; OLIVEIRA, L.Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M.P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.39, n.1, p.47-60, 2015.

Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA). Index ASBIA Mercado, 2019. Acesso em: 12/12/2020. Disponível em: <https://www.lancerural.com.br/vendas-de-semen-bovino-crescem-no-1o-semester-de-2018/presidente-da-asbiasergio-saud-anuncia-aumento-nas-vendas-de-semen/>.

BALARO, M.F.A.; MAIA, A.L.R.S.; OLIVEIRA, M.E.F.; CAJUEIRO, J.F.P.; ANDRADE, A.B.P.; BRANDÃO, F.Z. Diagnóstico ultrassonográfico de distúrbios reprodutivos em pequenos ruminantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.43, n.2, p.137-146, 2019.

BERGSTEIN, T.G.; WEISS, R.R; BICUDO, S.D. Técnicas de análise de sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.38, n.4, p.189-194, 2014.

BORGES-SILVA, J.C.; SILVA, M.R.; MARINHO, D.B.; NOGUEIRA, E.; SAMPAIO, D.C.; OLIVEIRA, L.O.F.; ABREU, U.G.P.; MOURÃO, G.B.; SARTORI, R. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, v.28, n.7, p.1004-1008, 2015.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J.L. V.; MIOT, H.A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v.45, n.4, p.325-334, 2009.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A.E.D.F.; UNANIAN, M.M.; DODE, M.A.N.D.; BARBOSA, R.T.; KASTELIC, J.P. Sexual development in early and late maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos Taurus* crossbred bulls in Brazil. *Theriogenology*, v.62, n.7, p.1.198-1.217, 2004.

BUETTNER, G.R. The pecking order of free-radicals and antioxidants: Lipid-peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v.300, p.535-543, 1993.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal, 3ª ed., Belo Horizonte, 2013. 104p.

CARDILLI, D.J.; SALES, J.N.S.; CANOLA, J.C. Ultrassonografia do sistema reprodutor masculino de bovinos. In: FELICIANO, M.A.R.; OLIVEIRA, M.E.F.; VICENTE, W.R.R. (org). *Ultrassonografia na Reprodução Animal*. 1ª ed., São Paulo, Editora MedVet, p.127-140, 2013.

CHANDOLIA, R.K.; HONARAMOOZ, A.; OMEKE, B.C.; PIERSON, R.; BEARD, A.P.; RAWLINGS, N.C. Assessment of development of the testes and accessory glands by

ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Theriogenology*, v.48, n.1, p.119-132, 1997.

CHENOWETH, P.J. Libido and behavior in bulls, boars and rams: A Review. *Theriogenology*, v.1, n.2, p.16-155, 1981.

CHENOWETH, P.J.; FARIN, P.W.; MATEOS, E.R.; RUPP, G.P.; PEXTON, J.E. Breeding soundness and sex drive by breed and age in beef bulls used for natural mating. *Theriogenology*, v.22, n.4, p.341-349, 1984.

CELEGHINI, E.C.C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186p. (Tese de Doutorado em Reprodução Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*, v.104, n.4, p.119-131, 2008.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.41, n.1, p.40-45, 2017.

ERDTMANN, B.A Genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, v.1, p.26-27, 2003.

FARREL, P.B.; FOOTE, R.N.; MCARDLE, M.M.; TROUERN, V.L.T.; TARDIF, A.L. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *Journal of Andrology*, v.17, n.3, p.293-300, 1996.

FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; CRESPILO, A.M.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JÚNIOR, J.A. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.33, n.4, p.213-222, 2009.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*, v.34, n.1, p.127-138, 1986.

GARCIA, A.R. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.33-39, 2017.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7ª ed., Barueri: Manole, 2004. 513p.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *American Journal of Medicine*, v.91, n.3, p.14-22, 1991.

JEYENDRANM, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PEREZ, M; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.70, n.1, p.219-228, 1984.

MARTINS, C.F.; DODE, M.N.; BÃO, S.N.; RUMPF, R. Método do TUNEL: uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatozoides bovinos. 192<sup>a</sup> ed., Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. 26p.

MORANI, E.S.C.; RODRIGUES, L.H.; RONCOLETTA, M. Manual de reprodução nas espécies domésticas: avaliação e empregabilidade do sêmen. 1<sup>a</sup> ed., São Paulo, Editora MedVet, 2018. 213p.

MENEGASSI, S.R.O.; BARCELLOS, J.O.J. (org). Aspectos Reprodutivos do Touro - Teoria e Prática. 1<sup>a</sup> ed., Guaíba, Agrolivros, p.119-125, 2015.

MENEGASSI, S.R.O.; BARCELLOS, J.O.J.; DIAS, E.A.; KOETZ JR, C.; PEREIRA, G.R.; PERIPOLLI, V.; MCMANUS, C.; CANOZZI, M.E.A.; LOPES, F.G. Scrotal infrared digital thermography as a predictor of seasonal effects on sperm traits in Braford bulls. *International Journal of Biometeorology*, v.59, n.3, p.357-364, 2015.

PALMER, C.W.; BRITO, L.F.C.; ARTEAGA, A.A.; SODERQUIS, L.; PERSSON, Y.; BARTH, A.D. Comparison of electroejaculation and transretal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. *Animal Reproduction Science*, v.87, n.1-2, p.25-31, 2005.

PASTORE, A.A.; TONIOLLO, G.H.; CARDILLI, D.J.; CANOLA, J.C.; MARCADANTE, E.Z. Contribuição da ultrassonografia na avaliação andrológica de bovinos Nelore. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.39, n.1, p.32-40, 2015.

PINEDA, N.R.; LEMOS, P.F.; FONSECA, V.O. Comparação entre dois testes de Avaliação do comportamento sexual (libido) de touros Nelore (*Bos taurus indicus*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.21, n.4, p.29-34, 1997.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKERS, A.S. Revival os spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v.164, n.4172, p.666, 1949.

RABELO, R.E.; SILVA, O.C. Aspectos morfofuncionais, clínicos e cirúrgicos do pênis, prepúcio e testículos de touros. 1<sup>a</sup> ed., Goiânia: Kelps, 2011. 212p.

SILVA, A.E.D.F.; UNANIAN, M.M.; CORDEIRO, C.M.T.; FREITAS, A.R. Relação da Circunferência Escrotal e Parâmetros da Qualidade do Sêmen em Touros da Raça Nelore, PO. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.31, n.3, p.1157-1165, 2002.

SILVA, P.F.N; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978, 2006.

SILVA, N.C.; LEÃO, K.M.; MOUTINHO, E.P.M.; SILVA, R.P.; RODRIGUES, M.C.; SILVA, M.A.P. Avaliação de dois diluentes e diferentes técnicas de criopreservação de sêmen bovino. *PubVet*, v.5, n.19, p.1118-1123, 2011.

SOUSA, G.H.; RIBEIRO, A.L.S.; LIMA, V.C.F.; MINERVINO, A.H.H.; SILVA, A.S.L.; NEVES, K.A.L.N. Ultrassonografia testicular em touros jovens e correlação com puberdade e produção espermática. *Agrarian*, v.13, n.49, p.426-436, 2020.

TAN, J.H.; NG, E.Y.K.; ACHARYA, U.R.; CHEE, C. Infrared thermography on ocular surface temperature: A review. *Infrared Physics and Technology*, v.52, n.4, p.97-108, 2009.

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; 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.

TSAKMAKIDIS, I.A. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research*, v.92, n.1-3, p.126-130, 2010.

VALE FILHO, V.R. Andrologia no touro: avaliação genital, exame do sêmen e classificação por pontos. *Revista Brasileira Reprodução Animal*. v.21, n.3, p.7-13, 1997.

VARNER, D.D. Developments in stallion sêmen evaluation. *Theriogenology*, v.70, n.3, p.448-462, 2008.

VITAL, R. J.; MATTOS, L. A.; SOUZA, L. R. M. F.; FIGUEIRÊDO, S. S.; SZEJNFELD, J. Aspectos ultrassonográficos das alterações não neoplásicas do testículo. *Radiologia Brasileira*, v.40, n.1, p.61-67, 2007.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal Reproduction Science*, v.60/61, n.1, p.349-355, 2000.

WALTERS, A.H.; EYESTONE, W.E.; SAAKE, R.G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. *Journal of Andrology*, v.25, n.4, p.554-563, 2004.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60, n.2, p.481-492, 2000.