



Teste de Avaliação do Metabolismo Espermático em Ovinos

Angela Maria Xavier Eloy¹
João Ricardo Furtado²

Embora várias técnicas analíticas tenham sido desenvolvidas para avaliar a qualidade espermática (concentração, motilidade, viabilidade e morfologia), não há em uso rotineiro um teste simples que proporcione informação completa sobre a qualidade do sêmen.

Algumas avaliações espermáticas utilizadas rotineiramente no Brasil levam em consideração testes subjetivos, que são fadados a equívocos, levando, portanto, a diagnósticos imprecisos, além de exigirem uma capacitação técnica mais refinada.

Testes mais precisos e de fácil realização são necessários para a seleção de animais em programas de melhoramento genético e, especialmente, para aqueles cujo sêmen se destina à congelamento.

O Resazurin (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-one 10-óxido), que é um corante metabólico, foi usado inicialmente para detectar bactérias no leite (1945) e, posteriormente, utilizado por Erb & Ehlers (1950) para testar sêmen bovino. Desde a década de 90, vem sendo empregado

com sucesso na previsão da fertilidade em várias espécies, inclusive em humanos.

Pretendeu-se, com este comunicado técnico, apresentar dentre as técnicas adotadas para avaliação da qualidade do sêmen, uma que seja de alta precisão, de simples adoção e que não requeira treinamento especializado, favorecendo as atividades de veterinários e de criadores de ovinos.

Princípio do Resazurin Teste (REZt)

O desempenho reprodutivo depende de processos metabólicos, portanto, o acesso ao *status* metabólico do espermatozóide poderá proporcionar informações valiosas sobre a capacidade fertilizante do sêmen.

Trabalhos mostram uma correlação do **REZt** com a concentração de adenosina trifosfato (ATP) no sêmen de humanos, espécie na qual os estudos estão mais avançados. Autores mencionam que a precisão e o valor prognóstico

¹Med. Vet., Ph. D., Embrapa Caprinos. Estrada Sobral/Groaíras, Km 04, Caixa Postal 145, CEP 62010-970 - Sobral/CE. Email: angela@cnpce.embrapa.br

²Assistente de pesquisa, Embrapa Caprinos. E-mail: ricardo@cnpce.embrapa.br

do teste são similares aos dos mais sofisticados métodos de determinação do ATP.

Os organismos vivos, animais e plantas, requerem um suprimento contínuo de energia para exercerem suas funções. Essa energia é usada em todos os processos para a manutenção do organismo vivo. Alguns processos acontecem continuamente, tais como o metabolismo dos alimentos, a síntese de importantes moléculas, como proteínas e DNA, e o transporte de moléculas e íons através do organismo. Outros acontecem somente em determinado período, como a contração muscular e outros movimentos celulares.

Os animais obtêm energia através da oxidação dos alimentos, e as plantas através da luz do sol por meio da clorofila. Contudo, antes de ser utilizada, a energia se transforma, de modo que o organismo possa usá-la facilmente. Este transportador de energia é a molécula de ATP.

O ATP consiste de um nucleotídeo (com o açúcar ribose) e três grupos de fosfato, que é utilizado pelo organismo através da ação de uma enzima (Fig. 1). Essa reação libera energia que poderá ser usada para a formação de proteínas, contração muscular, etc. Como produto, forma-se a adenosina difosfato (ADP) e o grupo fosfato tanto termina como ortofosfato (HP)₄ ou se liga a outra molécula. Se mais energia for extraída pela remoção do segundo grupo fosfato, há a produção da adenosina monofosfato (AMP).

O Resazurin teste (**REZt**) proporciona uma avaliação do metabolismo do espermatozóide ativo, mostrando visualmente uma mudança de cor durante determinado tempo. A atividade da desidrogenase espermática é manifestada pela variação da cor azul (resazurin) para róseo (resofurin) e, em seguida, para branco (diidroresorufin).

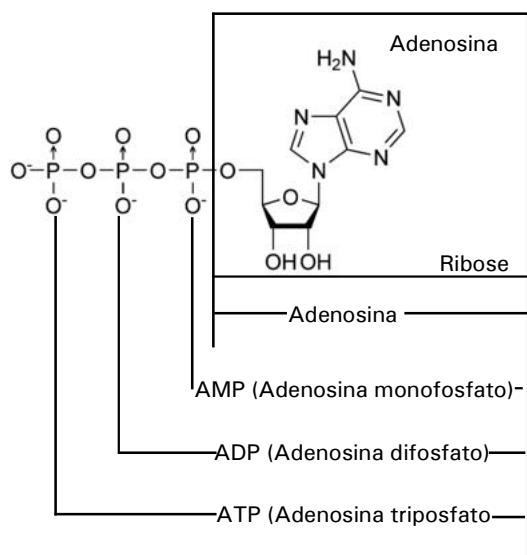


Fig. 1. Esquema gráfico da liberação de energia da molécula de ATP
Fonte: IRCC, 2006

Pesquisas têm apresentado resultados promissores com relação ao **REZt** em várias espécies. Em bovinos, observou-se alta correlação entre o teste e a taxa de fertilidade. Em ovinos e suínos tem se observado uma correlação com a qualidade do sêmen. Pesquisas também tentam correlacionar o Resazurin teste com a concentração espermática de espermatozoides vivos. Nesse contexto, a técnica usada por Martin et al. (1999) (3,1 mg de resazurin (0,9%) por 0,5 ml de amostra, revelou, em ovinos, que o **REZt** foi capaz de prever o número mínimo de espermatozoides móveis. Portanto, vários trabalhos foram realizados determinando-se a concentração mínima de espermatozoides capaz de desencadear a redução da cor de azul para róseo em "x" tempo e a concentração mínima capaz de não provocar a reação.

Resazurin Teste - A Técnica

Várias metodologias são utilizadas para avaliação do sêmen através do Resazurin. Algumas usam o espectrofotômetro para melhor mensurar a variação de cor; outras técnicas realizam o teste observando a variação a olho nu, sem auxílio de equipamentos; existem as que diluem o sêmen, etc.

O objetivo deste trabalho foi eleger uma técnica simples, sem o auxílio do espectrofotômetro e sem a necessidade de diluir o sêmen a ser avaliado, capaz de determinar a qualidade do sêmen através da predição da concentração de espermatozoides ativos/mL.

O sêmen de seis reprodutores ovinos foi coletado, quinzenalmente, perfazendo um total de cinquenta amostras, e foram avaliadas características como aspecto, volume (mL), e concentração total de espermatozoides ($\times 10^9$) e concentração de espermatozoides ativos ($\times 10^9$) através de espectrofotômetro.

Várias técnicas foram utilizadas, entre elas a de Dart et al. (1994), Mahmoud et al. (1994), Zalata et al. (1998), Martin et al. (1999) e Foote (1999). A técnica de Dart et al. (1994) foi a escolhida em virtude da simplicidade e dos resultados obtidos. Portanto, utilizando-se esse método, adicionou-se 8,8 mg de Resazurin (0,9% em solução salina) por mL de sêmen, homogeneizou-se a amostra e teve início o período de incubação a 37 ° C (Fig. 2). A observação da reação foi realizada a cada quinze segundos, imediatamente após a homogeneização, e teve duração de quinze minutos.

Como exemplo, a Fig. 3 mostra o início da alteração de cor do azul para o róseo. Vale mencionar que essa figura retrata o experimento no qual observou-se que as amostras 1 e 2 apresentaram redução dentro de dez segundos, com

concentração espermática ativa acima de $1,4 \times 10^9$ espermatozoides, enquanto a amostra 3, com concentração abaixo de $1,4 \times 10^9$ demorou mais de quinze minutos. O tempo despendido para redução do azul para o róseo e deste para o branco, revela a capacidade metabólica dos espermatozoides e sua relação com a qualidade do sêmen. A Fig. 4 mostra a redução do resofurin (róseo) para diidroresofurin (branco), que também é um indicativo da concentração de ATP nas células ativas. Com essas observações, conclui-se que as amostras 1 e 2 apresentam maior quantidade de ATP nas células espermáticas e concentração de espermatozoides ativos acima de $1,4 \times 10^9$. Por conseguinte, esses espermatozoides apresentam maior capacidade fertilizante (amostras 1 e 2) do que a amostra 3, embora tenham apresentado mesma motilidade progressiva inicial na análise pós-colheita.



Fig. 2. Início da redução do Resazurin exibindo coloração azul.

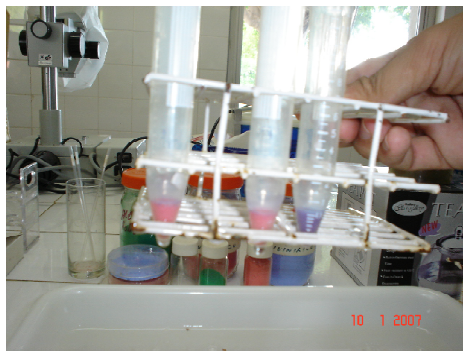


Fig. 3. Redução do Resazurin para resofurin com diferentes reações durante mesmo período de tempo em três ovinos da raça Santa Inês.



Fig. 4. Reação após 15 minutos de incubação, apresentando o retorno do róseo para o branco em três ovinos da raça Santa Inês.

De acordo com as observações feitas, as amostras de sêmen que apresentaram redução do azul para o róseo dentro de sessenta segundos, apresentam melhor metabolismo e qualidade espermáticas. Adicionalmente, em outro teste, observou-se que alguns animais apresentaram um alto escore de motilidade progressiva individual na primeira leitura (90) com vigor 4 e, no **REZt**, ultrapassou os 60 segundos para mudar a coloração. Realizou-se então, após 30 minutos, a segunda leitura, que mostrou uma queda acentuada na motilidade, corroborando com os resultados do teste.

De acordo com os achados do presente trabalho e corroborando com os de Martin et al., (1999), sugere-se a seguinte proposição para avaliação do sêmen através do **REZt**:

Concentração de espermatozoides vivos ($\times 10^9$)	Resofurin (min)	Diidroresofurin (min)
< 1,4	> 1	> 7,5
> 1,4	< 1	< 6,0

Considerações Finais

Tendo em vista a necessidade de disponibilizar um teste viável, de fácil operacionalização, podendo ser realizado a campo, eficiente em seus princípios, e que, principalmente não seja subjetivo e assegure o menor erro possível, propõe-se a utilização do **REZt** como um teste complementar ou opção de avaliação da capacidade espermática para seleção de reprodutores ovinos.

Literatura Consultada

COOPER, T. A.; WANG, S.; LIU, Y.; BUNCH, T. D.; HOLYOAK, G. R. A new method to evaluate the viability of cryopreserved ram semen using a resazurin reduction assay. **Theriogenology**, v. 45, p. 313, 1996.

DART, M. G.; MESTA, J.; CRESHAW, C.; ERICSSON, S. A. Modified resazurin reduction test for determining the fertility potential of bovine spermatozoa. **Archives of Andrology**, v. 33, p. 71-75, 1994.

ERB, R. E.; EHLERS, F. H. Resazurin reducing times as an indicator of semen fertilizing capacity. **Journal of Dairy Science**, v. 32, p. 853, 1950.

FOOTE, R. H. Resazurin reduction and other tests of semen quality and fertility of bulls. **Asian Journal of Andrology**, v. 1, p. 109-114, 1999.

GLASS, R. H.; ERICSSON, S. A.; ERICSSON, R. J.; DROUIN, M. T.; MARCOUX, L.J.; SULLIVAN, H. The resazurin reduction teste provides na assessment of sperm activity. **Fertility and Sterility**, v. 56, p. 743-6, 1991.

HOLT, W. V.; MEDRANO, A. Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 52, p. 213-222, 1997.

MAHMOUD, A. M.; COMHAIRE, F. H.; VERMEULEN, L.; ANDREOU, E. Comparison of the resazurin test, adenosine triphosphate in semen, and various sperm parameters. **Human Reproduction**, v. 9, p. 1688-1693, 1994.

MARTIN, L. M.; CRENSHAW, C. C.; DEAN Jr., J. A.; DART, M. G.; PURDY, P. H.; ERICSSON, S. A. Detarmination of the number of motile sperm within na ovne semen sample using resazurin. **Small Ruminant Research**, v. 32, p. 161-165, 1999.

REDDY, K. V.; MEHERJI, P. K.; GOKRAL, J. S.; SHAHANI, S. K. Resazurin reduction test to evaluate semen quality. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 35, p. 369-373, 1997.

ZALATA, A. A.; LAMMERTIJN, N.; CHRISTOPHE, A.; COMHAIRE, F. H. The correlates and alleged biochemical background of the resazurin reduction test in semen. **International Journal of Andrology**, v. 21, p. 289-294, 1998.

ZRIMSEK, P.; KUNC, J.; KOSEC, M.; MRKUN, J. Spectrophotometric application of resazirin reduction assay to evaluate boar semen quality. **International Journal of Andrology**, v. 27, p. 57-62, 2004.

IRCC. Disponível em: <http://faculty.ircc.edu/faculty/wtyler/BSC1010%20link%20page.htm>. Acesso em: 21 jan 06.

**Comunicado
Técnico, 71
On Line**



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos

Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 - Caixa

Postal 145, CEP 62010-970 Sobral, CE

Fone: (0xx88) 3677-7000

Fax: (0xx88) 3677-7055

Home-page: www.cnpc.embrapa.br

E-mail: www.cnpc.embrapa.br/sac.htm

1ª edição *On line* (dez./2006)

**Comitê de
publicações**

Expediente

Presidente: *Diônes Oliveira dos Santos*

Secretária-Executiva: *Luciana Cristine Vasques Villela*

Membros: *Alexandre César Silva Marinho*

Verônica Vasconcelos Freire

Marcelo Renato Alves Araújo

Tânia Maria Chaves Campêlo

Supervisor editorial: *Alexandre César Silva Marinho*

Revisão de texto: *José Carlos Mendes Vasconcelos*

Normalização bibliográfica: *Alexandre C. S. Marinho*

Editoração eletrônica: *Alexandre César Silva Marinho*