

## NOTAS CIENTÍFICAS

### COMPRIMENTO DA PEÇA INTERMEDIÁRIA DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS E SUAS RELAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN E FERTILIDADE<sup>1</sup>

ROGÉRIO TAVEIRA BARBOSA<sup>2</sup>, CÉSAR ROBERTO ESPER<sup>3</sup> e ALFREDO RIBEIRO DE FREITAS<sup>4</sup>

RESUMO - Visando identificar preditores de fertilidade em touros, foram estimados os coeficientes de correlação do comprimento da peça intermediária (CPI) dos espermatozóides com características físicas e metabólicas do sêmen e fertilidade. Utilizaram-se amostras de sêmen de 50 touros mestiços, submetidos a teste de progênie. O CPI foi determinado em 40 espermatozóides de cada touro por um sistema de análise de imagens (Videoplan). Além das características físicas antes e após a congelação, foram verificados a velocidade do consumo de oxigênio e o índice de atividade citoquímica do sêmen desses touros. Os coeficientes de correlação entre o CPI e os resultados da avaliação física e metabólica do sêmen e fertilidade foram baixos e não significativos ( $P > 0,05$ ), não sendo o CPI considerado como um bom indicador da fertilidade.

#### MIDPIECE LENGTH OF BOVINE SPERMATOZOA AND ITS RELATIONSHIPS TO SEMEN TRAITS AND FERTILITY

ABSTRACT - With the objective of identifying predictors of fertility in bulls, the correlation coefficients of the midpiece length of bovine spermatozoa with semen traits and fertility were estimated. Data were obtained from semen samples of 50 crossbred bulls submitted to a progeny test. The midpiece length was determined in 40 midpieces of each bull through a image analysis system (Videoplan). Besides the physical traits before and after semen freezing, the oxygen consumption rate and the cytochemical activity index were observed. The correlation coefficients were low and non-significant ( $P > 0.05$ ), indicating that the midpiece length is not a good predictor of fertility.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 19 de março de 1998.

<sup>2</sup> Méd. Veterinário, Dr., Embrapa-Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE), Caixa Postal 339, CEP 13560-970 São Carlos, SP. E-mail: rogerio@cppse.embrapa.br

<sup>3</sup> Méd. Veterinário, Dr., UNESP-FCAV, Campus de Jaboticabal, Rodovia Carlos Tonanni, km 05, CEP 14870-000 Jaboticabal, SP.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Dr., Embrapa-CPPSE.

A peça intermediária dos espermatozóides de mamíferos é composta por giros de mitocôndrias circundando a região proximal do flagelo. Um possível aumento em seu comprimento pode estar associado a uma maior taxa de fosforilação oxidativa e, assim, à maior atividade metabólica com efeitos sobre a motilidade ou vitalidade do espermatozóide, já que as mitocôndrias são as transformadoras de energia para a célula (Woolley, 1971; Eddy, 1988).

Existe considerável variação no comprimento da peça intermediária entre espécies de mamíferos (Cummins & Woodall, 1985) e entre indivíduos de uma mesma espécie (Woolley, 1971) ou raça (Mukherjee & Singh, 1965), sendo essas variações na morfometria gamética devidas ao genótipo (Braden, 1959) e atribuídas ao conteúdo mitocondrial, conforme verificado por Woolley (1971).

Diante de tais evidências e considerando a alta herdabilidade quanto a esta característica (Woolley & Beatty, 1967; Woolley, 1971; Lukefahr & Hohenboken, 1981) e a possibilidade e necessidade de seleção genética para fertilidade (Land, 1978; Raheja et al., 1989; Notter, 1995), é desejável o desenvolvimento de testes e a obtenção de indicadores biológicos que reflitam a habilidade fertilizadora do espermatozóide, permitindo a seleção precoce de touros de fertilidade superior, necessários para a manutenção de altas taxas reprodutivas nos sistemas de produção.

Os objetivos deste trabalho foram determinar o comprimento da peça intermediária dos espermatozoides em amostras de sêmen bovino congelado e estimar os coeficientes de correlação com as características físicas do sêmen, a atividade metabólica e a fertilidade das inseminações artificiais.

Foram utilizados 50 reprodutores bovinos mestiços de três grupos genéticos que haviam sido avaliados em teste de progênie no período de 1978 a 1990 (Freitas, 1989), cujo sêmen havia sido congelado no laboratório de processamento de sêmen da Embrapa-Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste, em São Carlos, SP. Amostras de sêmen, provenientes de uma mesma partida de cada touro, foram submetidas à avaliação (após a descongelação em água a 37°C por 30 segundos) da motilidade e vigor espermáticos, velocidade de consumo de oxigênio, atividade citocromo oxidase e comprimento da peça intermediária. A motilidade (%) e o vigor (0-5) espermáticos foram avaliados subjetivamente sob microscopia óptica de contraste de fase; o consumo de oxigênio em oxígrafo Gilson com eletrodo tipo Clark e câmara de respiração mantida a 37°C, em dois ensaios. Para cada ensaio de respiração, duas doses eram descongeladas, o sêmen centrifugado por duas vezes em meio de Ringer a 150 g x 10 minutos, e o sedimento ressuspensão em 0,2 mL de Ringer transferido para a câmara de respiração, onde o consumo de oxigênio dos espermatozoides era registrado. Ao final de cada ensaio era verificada a concentração espermática da suspensão através de câmara hematimétrica, sendo o consumo de oxigênio calculado e expresso em  $\mu\text{L O}_2/\text{hora}/10^8$  espermatozoides.

A atividade citocromo oxidase foi determinada após incubação a 37°C de uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$  de sêmen com 750  $\mu\text{L}$  de meio DAB, obtido pela dissolução de 3,3'- diaminobenzidina a uma concentração de 1 mg/mL, em tampão fosfato de sódio 0,15 M, pH 7,2. Após uma hora de incubação na ausência de luz, dois esfregaços foram preparados e avaliados sob imersão, em objetiva 100x sob microscopia óptica de contraste de fase. Foram classificados 100 espermatozoides por lâmina, seguindo a escala de quatro classes proposta por Hrudka (1987), e determinado o índice de atividade citoquímica, em percentagem.

Utilizando-se um sistema de análise de imagens (Videoplan), foi determinado o comprimento da peça intermediária em 40 espermatozoides no esfregaço de sêmen de cada touro, após prévia incubação em meio DAB e coloração segundo Kovacs & Foote (1992), e o resultado expresso em  $\mu\text{m}$ .

A congelabilidade dos ejaculados foi avaliada pela razão entre a motilidade após a descongelação e a inicial, expressa em percentagem. A estimativa da fertilidade foi obtida pela taxa de gestação (%) calculada pela relação entre as gestações obtidas e 1.934 inseminações artificiais realizadas, durante a realização do teste de progênie, no rebanho do Campo Experimental Fazenda Santa Mônica, Valença, RJ, Unidade da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite.

As características analisadas foram motilidade e vigor espermáticos antes e após a congelação, comprimento da peça intermediária, consumo de oxigênio, índice de atividade citoquímica, congelabilidade e taxa de gestação. As observações foram analisadas através dos procedimentos disponíveis no Statistical Analysis System (SAS, 1988). Os dados foram analisados por meio do seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + D_j + (G \times D)_{ij} + T(GD)_{l(ij)} + e_{ijkl}$$

onde,

$Y_{ijkl}$  = valor observado no k-ésimo touro, no j-ésimo diluente, i-ésimo grupo genético l-ésima medida do CPI;

$\mu$  = média geral;

$G_i, D_j$  = efeitos fixos de grupo genético e de diluente, respectivamente;

$(G \times D)_{ij}$  = efeito da interação de  $G_i$  e  $D_j$ ;

$T(GD)_{l(ij)}$  = efeito aleatório de touros dentro de grupo genético-diluente; e

$e_{ijkl}$  = erro aleatório.

A média ( $\pm$  erro padrão), amplitude e coeficiente de variação dos espermatozoides nos 50 touros mestiços foi de  $13,10 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ,  $11,53$  a  $15,04 \mu\text{m}$  e  $6,44\%$ , respectivamente. O valor encontrado para a média do comprimento da peça intermediária é semelhante àqueles verificados por Mukherjee & Singh (1965), Kojima (1966), Lukefahr & Hohenboken (1981) e Rao & Rao (1984). É superior aos valores observados por Cummins & Woodall (1985) e por Koley & Mukherjee (1985); e inferior aos de Pandya et al. (1985). Coeficientes de variação semelhantes ao do presente trabalho foram verificados por Lukefahr & Hohenboken (1981) e por Pandya et al. (1985).

A análise de variância evidenciou diferenças altamente significativas ( $P < 0,001$ ) entre touros dentro de grupo genético-diluente quanto ao comprimento da peça intermediária. Em se tratando de genótipos, esta observação é semelhante às de Mukherjee & Singh (1965), que observaram diferenças entre raças zebuínas, e às de Koley & Mukherjee (1985), ao verificarem diferenças significativas entre diversos genótipos. As

variações significativas entre touros observadas no presente trabalho foram também descritas por Mukherjee & Singh (1965), Lukefahr & Hohenboken (1981) e Koley et al. (1985).

A utilização de maior número de medidas do comprimento da peça intermediária por touro foi suficiente para detectar diferenças significativas entre touros, o que está de acordo com Braden (1959). A ausência de diferenças significativas no comprimento na peça intermediária entre indivíduos, verificadas por Rao & Rao (1984) e Pandya et al. (1985), pode ser causada pelo reduzido número de medidas realizadas por aqueles autores.

Os coeficientes de correlação simples entre comprimento da peça intermediária e características físicas avaliadas no sêmen, atividade mitocondrial, congelabilidade e fertilidade (Tabela 1) foram todos baixos e não significativos ( $P > 0,05$ ). Tais observações são semelhantes às verificadas por Lukefahr & Hohenboken (1981) que também verificaram coeficientes de correlação entre algumas características do sêmen e fertilidade com o comprimento da peça intermediária próximos de zero.

Embora exista uma série de evidências favoráveis à identificação precoce e seleção de touros com maior comprimento da peça intermediária dos espermatozoides (Mukherjee & Singh, 1965; Woolley & Beatty, 1967; Woolley, 1971; Lukefahr & Hohenboken, 1981; Mann & Lutwak-Mann, 1981; Roldan & Gomendio, 1992) e exista diferença significativa ( $P < 0,001$ ) entre touros, esta característica não foi um bom marcador biológico da fertilidade em touros mestiços.

**TABELA 1. Coeficientes de correlação entre o comprimento da peça intermediária, motilidade e vigor antes e após a congelação, consumo de oxigênio, índice de atividade citoquímica e taxa de gestação em sêmen de touros mestiços.**

Característica	Comprimento da peça intermediária
Motilidade pré-congelação	-0,09
Motilidade pós-descongelação	-0,09
Vigor pré-congelação	-0,09
Vigor pós-descongelação	0,14
Consumo de oxigênio	0,12
Índice de atividade citoquímica	0,16
Congelabilidade	-0,07
Taxa de gestação	0,22

## REFERÊNCIAS

- BRADEN, A.W.H. Strain differences in the morphology of the gametes of the mouse. **Australian Journal of Biological Sciences**, Victoria, v.12, n.1, p.65-71, 1959.
- CUMMINS, J.M.; WOODALL, P.F. On mammalian sperm dimensions. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v.75, p.153-175, 1985.
- EDDY, E.M. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Eds.). **Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p.27-68.
- FREITAS, A.F. **Desenvolvimento do gado Mestiço Leiteiro Brasileiro (MLB)**. Coronel Pacheco: Embrapa-CNPGL, 1989. 4p. (Embrapa. CNPGL. Comunicado técnico, 7).
- HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome C oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v.10, n.6, p.809-828, 1987.
- KOJIMA, Y. Electron microscopic study of the bull spermatozoa. IV Structure of the middle piece. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v.14, n.1/2, p.33-42, 1966.
- KOLEY, N.; MUKHERJEE, D.P. Pattern of inheritance in the dimensional characteristics of bull spermatozoa. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v.62, n.10, p.882-886, 1985.

- KOVACS, A.; FOOTE, R.H. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. **Biotechnology and Histochemistry**, v.67, n.3, p.119-124, 1992.
- LAND, R.B. Genetic improvement of mammalian fertility: a review of opportunities. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.1, n.2, p.109-135, 1978.
- LUKEFAHR, S.D.; HOHENBOKEN, W. Characteristics of spermatozoan midpiece length and its relationship with economically important traits in cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.64, n.3, p.508-512, Mar., 1981.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen**. New York: Springer-Verlag, 1981. 495p.
- MUKHERJEE, D.P.; SINGH, S.P. Breed differences in characteristics of bull spermatozoa. **Indian Journal of Veterinary Science**, v.35, n.3, p.213-220, 1965.
- NOTTER, D.R. Genetic improvement of fertility using correlated traits and molecular markers. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais ...** Belo Horizonte: CBRA, 1995. p.121-130.
- PANDYA, D.K.; JOHAR, K.S.; SINGH, A. Study on dimensional characteristics of Jersey bull spermatozoa. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v.62, n.6, p.494-498, June 1985.
- RAHEJA, K.L.; NADARAJAH, K.; BURNSIDE, E.B. Relationship of bull fertility with daughter fertility and production traits in Holstein dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.72, n.10, p.2679-2682, Oct. 1989.
- RAO, T.L.N.; RAO, A.R. Biometrics of spermatozoa of Ongole bulls. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v.61, n.7, p.619-620, July 1984.
- ROLDAN, E.R.S.; GOMENDIO, M. Morphological, functional and biochemical changes underlying the preparation and selection of fertilizing spermatozoa "in vivo". **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.28, p.69-78, July, 1992.
- SAS INSTITUTE INC. (Cary, NC). **Statistical Analysis System- 6**. 3.ed. Cary, NC, 1988. 1028p.
- WOOLLEY, D.W. Selection for the length of the spermatozoan midpiece in the mouse. **Genetical Research**, London, v.16, p.261-275, 1971.
- WOOLLEY, D.W.; BEATTY, R.A. Inheritance of midpiece length in mouse spermatozoa. **Nature**, v.215, p.94-95, 1967.