

Teste de termorresistência (TTR): quando e como utilizar?

Juliana Corrêa Borges Silva^{1*}, André Maciel Crespilho^{2,3**}

¹Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil; ²Central Bela Vista, Botucatu, SP, Brasil; Universidade Santo Amaro, São Paulo, SP, Brasil

Resumo

Na tentativa de mimetizar o desafio vivenciado pelos espermatozoides durante o trajeto pelo trato reprodutor feminino Dimitropoulos (1967) foi quem primeiro sugeriu a adoção de um teste de termorresistência (TTR), que logo se popularizou como metodologia capaz de agregar maior acurácia na predição laboratorial do potencial de fertilidade espermática. Embora de fácil e rápida execução, uma série de fatores podem influenciar os resultados do teste, dificultando a interpretação e, por consequência, interferindo na avaliação da real aplicabilidade do TTR no contexto na análise de qualidade do sêmen bovino. Essa revisão tem por objetivo apresentar as bases teóricas dos testes de termorresistência, suas variações, interações e fatores de influência, discutindo aspectos relacionados a sua aplicabilidade e limitações como teste de qualidade (*in vitro*) e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial.

Palavras-chave: Avaliação espermática; Incubação, Qualidade seminal; Taxa de concepção; Touro.

Abstract

Developed to mimic the challenge experienced by spermatozoa during the journey through the female reproductive tract, Dimitropoulos (1967) was the first one who suggested the use of thermoresistance tests (TRT); after that, the test has become popular as a methodology capable of adding accuracy to laboratory prediction of bovine semen fertility. Although easy and quick to perform, there are multiple factors that can influence the test, resulting in misinterpretation and difficulty the evaluation of applicability of TRT in the context of bovine semen analysis. This review aims to present the theoretical bases of thermoresistance tests, their variations, interactions and influencing factors, discussing aspects related to their applicability and limitations as a quality control test (in vitro) and for evaluation of fertility potential of frozen-thawed semen used for artificial insemination programs.

Keywords: Bull; Incubation; Pregnancy rate; Seminal quality; Sperm evaluation.

Introdução

A fertilidade do sêmen em programas de inseminação artificial representa uma característica multifatorial, que depende da qualidade do manejo do rebanho, da própria técnica de inseminação, do inseminador, da fertilidade das fêmeas, do momento correto para realização das inseminações, da fertilidade do macho (efeito touro) e da qualidade do sêmen (Selem et al., 2015). Mesmo frente a multifatorialidade de características que exercem influência sobre a fertilidade, pesquisadores e indústria de todo o Mundo têm buscado ao longo das últimas décadas o desenvolvimento de ensaios laboratoriais capazes de prever com acurácia o potencial de fertilização de amostras de sêmen. Tal objetivo, segundo Graham e Mocé (2005) representa um desafio científico de difícil transposição, tendo em vista a própria complexidade da célula espermática, que depende de múltiplos atributos, incluindo aspectos físicos (integridade das membranas plasmática e acrossomal, integridade de DNA), bioquímicos (atividade mitocondrial para geração de energia para movimentação, interação com íons, proteínas, lipídeos, miRNAs e moléculas regulatórias) e funcionais (capacidade de iniciar processo de hiperativação, reação acrossomal, interação com zona pelúcida e membrana do ovócito, descondensação do DNA e realização da singamia).

Dessa forma, na tentativa de desenvolver um teste laboratorial multiparamétrico, capaz de mimetizar os desafios vivenciados pelos espermatozoides depositados no trato reprodutor feminino, que dependem da manutenção de padrão metabólico adequado, garantindo movimentação por longos períodos para acessar o ovócito nas tubas uterinas, Dimitropoulos (1967) propôs a condução dos chamados testes de termorresistência (TTR). Embora os testes de termorresistência tenham sido propostos há décadas e

implementados em muitos laboratórios de andrologia em todo o Mundo, até o presente pairam dúvidas a respeito da real aplicabilidade do TTR, justificando o presente trabalho de revisão crítica a respeito do tema.

Histórico e conceito do teste

O teste de termorresistência ou simplesmente TTR foi inicialmente proposto por Dimitropoulos em 1967 que utilizou período de incubação de 5 horas a 38°C como metodologia para determinação do potencial de fertilização do sêmen bovino. Embora o teste inicialmente proposto tenha se mostrado uma alternativa viável para análise de sêmen bovino, o longo período dispendido para incubação das amostras motivou o mesmo pesquisador a propor um teste mais rápido, contando com incubação de apenas 30 minutos, porém sob uma faixa de temperatura mais elevada (46°C). Dessa forma surgiu a base do que nos tempos atuais são conhecidos como testes de termorresistência lento (TTRL) e rápido (TTRR), que utilizam a mesma base metodológica, composta pela análise de movimento espermático após períodos variáveis (tempo e temperatura) de incubação.

Descritos e empregados para análise de qualidade de sêmen de diferentes espécies (domésticas e selvagens) o teste possui sua fundamentação teórica relacionada à própria cronologia do processo de reprodução animal: fêmeas iniciam sintomatologia (física, endocrinológica, comportamental) de estro com aceitação da monta do macho previamente à ocorrência do processo ovulatório, exigindo que espermatozoides depositados no trato reprodutor feminino possuam longevidade (TTRL) e resiliência (TTRR e TTRL) suficientes para acessar o ovócito feminino e realizar o processo de fertilização. Dessa forma, para amostras de sêmen bovino com adequado potencial de fertilidade se esperam valores mínimos de motilidade total de 15% para sêmen pós-descongelamento e 70% para sêmen fresco após a condução dos testes de incubação (CBRA, 2013; Talini et al., 2019).

Variações metodológicas (tipos de testes) para condução do TTR

Diferente de análises estruturais e/ou funcionais conduzidas em microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo, do ponto de vista metodológico, os testes de termorresistência apresentam baixa complexidade operacional, semelhante a análise convencional de motilidade espermática, o que facilita a adoção por laboratórios com diferentes níveis de tecnificação. No entanto, diversas são as variações para o TTR que podem ser encontradas na literatura, cenário que muitas vezes dificulta a comparação de resultados entre diferentes laboratórios, mesmo para análises conduzidas para as mesmas partidas de sêmen.

Tempo e temperatura de incubação

Além dos originalmente propostos testes de termorresistência lentos (incubação por 5 horas) e rápidos (30 minutos) uma gama de diferentes combinações de tempos e temperaturas de incubação podem ser encontrados na literatura. Nesse sentido Benvenuto et al., (2022) testaram 3 variações do teste de termorresistência rápido à 46°C (incubação por 30, 45 e 60 minutos) e 3 do lento a 38°C (3, 5 e 8 horas) para análise de sêmen bovino pós-descongelamento; nesse estudo os autores observaram maiores médias para motilidade total (MT) e progressiva (MP), além de maior proporção de espermatozoides íntegros em doses de sêmen submetidas a TTRL em relação ao mesmo material avaliado pós testes rápidos de incubação, sob temperatura de 46°C. Da mesma forma, Talini et al. (2019) também observaram maior preservação de motilidade para amostras incubadas à 38°C em relação àquelas submetidas a temperatura de 46°C; em relação ao TTRL os autores ainda relataram relação inversa entre tempo de incubação (1 hr, 3 hrs ou 5 hrs) a 38°C e motilidade espermática, concluindo que a expansão do período de incubação acarreta em esgotamento metabólico celular.

De acordo com Borges, (2008) uma outra opção de teste representa o TTR lento modificado ou fisiológico (TTRLM), que consiste na incubação das amostras por um período de 3 horas a 37°C, sendo verificado o vigor e percentual de células com motilidade progressiva a cada 60 minutos, ao longo do período de incubação de 3 horas (T0, T1hr, T2hrs e T3hrs). Além da rapidez do teste em comparação ao tradicional TTRL, a técnica de TTRLM permite melhor avaliação do grau de resiliência espermática ao longo do período de incubação. De maneira geral, nas provas de TTRLM se espera a redução de 5 a 10 pontos percentuais para os valores de motilidade espermática total a cada hora de incubação do sêmen na faixa de temperatura entre 37°C e 38°C.

Embora a grande maioria dos estudos concorde que o TTRL representa uma metodologia “mais gentil”, permitindo a incubação do sêmen sob faixas de temperatura mais próximas às fisiologicamente encontradas no trato reprodutor feminino, torna-se importante reiterar o objetivo primário dos testes de

incubação, que representa a avaliação de longevidade e resiliência espermática. De acordo com Barnabé et al. (1981) pode-se observar correlação significativa entre os testes rápidos e lentos, sendo que a praticidade e menor consumo de tempo do TTRR pode representar fator determinante para sua escolha.

Dessa forma, é possível concluir que não há um consenso sobre qual a melhor metodologia a ser utilizada. Questões como qual o melhor microambiente para o teste (células incubadas em temperaturas próximas ao fisiológico ou estresse térmico celular em condições suprafisiológicas?), quais as principais diferenças e semelhanças entre TTRR e TTRL, vantagens e desvantagens de cada tipo de análise, entre outras questões ainda permanecem sem uma definição clara na literatura.

Independentemente do tipo de teste de termorresistência, torna-se importante destacar que muitos fatores podem influenciar os resultados do TTR, como a ausência ou tipo de diluidor utilizado, o tempo e temperatura de incubação, o volume das amostras, concentração de espermatozoides, o método de avaliação da motilidade (subjéctiva ou CASA); dessa forma, torna-se imperativo que todas as fontes de variação sejam consideradas e criticamente avaliadas para que seja possível estabelecer maior padronização no uso do TTR, agregando maior repetibilidade ao teste.

Correlações TTR e qualidade do sêmen *in vitro*

Oliveira et al. (2017) destacaram a importância da condução de ensaios que promovam o estresse dos espermatozoides previamente a realização dos testes laboratoriais para análise de qualidade espermática; de acordo com os autores, a indução do estresse aumenta a chance de diagnóstico de alterações espermáticas subletais, não manifestas imediatamente pós-descongelamento do sêmen. Frente a esse conceito básico diversos estudos anteriores buscaram associar os resultados dos testes de termorresistência com diferentes características de qualidade do sêmen de diversas espécies. Nesse sentido, Barnabé et al. (1981) encontraram correlações significativas ($r=0,3$) entre integridade acrossomal e motilidade progressiva pós-TTR rápido (descongelamento e posterior manutenção em banho-maria a 45°C por 1 hora) de espermatozoides bovinos, indicando ainda que à medida que a motilidade decai ao longo do TTR se observa aumento das alterações morfológicas de acrossomo. Da mesma forma Siqueira et al., (2007) observaram correlações positivas ($r=0,64$; $P<0,05$) entre a integridade da membrana plasmática avaliada por meio de teste hiposmótico e a motilidade espermática pós-TTR lento.

Em recente levantamento de dados (Central Bela Vista, 2024; dados não publicados) foram computadas 9227 inseminações artificiais em tempo-fixado (IATF) em uma mesma propriedade comercial, utilizando 11 diferentes reprodutores da raça Nelore; todas as partidas de sêmen empregadas na IATF foram previamente submetidas à análise de movimento espermático (CASA, pós-descongelamento e após TTRR), integridade de membrana plasmática (microscopia de fluorescência) e avaliação morfológica (contraste de interferência diferencial). Nesse estudo foram observadas correlações negativas entre os resultados de motilidade espermática total (MT) e progressiva (MP) pós-TTRR ($46^{\circ}\text{C}/30$ minutos) com o percentual de defeitos maiores ($r=-0,37$ e $r=-0,32$, respectivamente; $P<0,0001$). Correlações significativas também foram observadas para MT e MP pós-TTRR com a integridade de membrana plasmática pós-descongelamento ($r=0,22$ e $0,18$, respectivamente; $P<0,0001$), reiterando a existência de relação (mesmo que de baixa intensidade) entre os resultados dos testes de incubação com parâmetros estruturais de espermatozoides bovinos.

Correlações entre TTR e fertilidade do sêmen bovino

A despeito das correlações positivas entre os resultados da análise de movimento pós-TTR e a qualidade do sêmen de diferentes espécies, a relação dos testes de termorresistência com fertilidade *in vivo* permanece sem uma definição clara na literatura. De acordo com Vianna et al. (2009) amostras de sêmen bovino com alto percentual de células móveis pós-TTR podem determinar resultados semelhantes (para certos touros até resultados inferiores) em relação a partidas de sêmen com baixo padrão de movimento pós-incubação. De acordo com os autores, ambos os testes de incubação (TTRR e TTRL) apresentam baixas correlações com fertilidade ($r=0,11$ e $r=0,14$, respectivamente).

Talini et al. (2019) observaram correlações significativas entre os resultados da avaliação de movimento espermático pós TTRR e TTRL com a taxa de concepção de vacas multíparas submetidas a protocolo de IATF; no entanto, tais correlações se mostraram negativas nesse estudo ($r=-0,64$ e $r=-0,75$, respectivamente para TTRL de 3hrs e 5hrs) indicando aplicabilidade restrita dos testes de incubação como ferramentas preditivas de fertilidade de doses de sêmen bovino congelado.

Embora os testes de incubação sejam populares em boa parte dos laboratórios de andrologia, são escassos estudos atuais que avaliam as possíveis relações entre os resultados do TTR e a fertilidade do

sêmen bovino. De acordo com a experiência dos autores e com base em estudos publicados anteriormente (Dimitropoulos, 1967; Arruda et al., 1992; Silva, 2000), se assume a existência de correlações entre os resultados do TTR e fertilidade *in vivo*, porém tais associações são de baixa intensidade e com limitado potencial preditivo para as taxas de concepção em programas de inseminação artificial. No entanto, a associação dos resultados das provas de termorresistência com outras variáveis de qualidade espermática (análises cinéticas, estruturais e funcionais) melhoram o poder preditivo dos testes laboratoriais, permitindo a criação de modelos matemáticos mistos capazes de explicar com maior acurácia as variações de fertilidade observadas para doses de sêmen bovino congelado (Sellem et al., 2017; Silva et al., 2023).

Considerações

Os testes de termorresistência representam métodos práticos e de fácil implantação em laboratórios dos mais variados níveis de tecnificação, justificando a ampla difusão em Centros de Andrologia de todo o mundo. Mesmo apresentando baixo nível de dificuldade para execução, não existe consenso sobre a melhor metodologia (tempo de incubação, temperatura, forma de leitura, interpretação) para realização do TTR, dificultando a padronização da técnica. Embora os testes de incubação representem análises do grau resiliência e longevidade espermática (fatores importantes para a ocorrência do processo de fertilização), geralmente os resultados do TTR apresentam baixas correlações com fertilidade *in vivo* quando considerados isoladamente.

Referências

- Arruda RP, Barnabé VH, Alencar MM, Barnabé RC.** Avaliação de sêmen congelado de Bovinos. Provas lenta e rápida de termorresistência: Efeitos sobre a fertilidade. *Bras J Vet Res Anim Sci*, v.29, p.131–137, 1992.
- Barnabé VH, Barnabé RC, Visintin JÁ, Viana WG, Casagrande JF, Almeida C.** Correlações entre motilidade progressiva e retenção do acrossomo em sêmen congelado de bovinos após o descongelamento e após provas de termo resistência. *Rev Fac Med Vet Zoot Univ SP*, v.18, p.61-8, 1981.
- Barnabé VH, Barnabé RC, Visintin JA, Viana WG, Casagrande JF, Almeida C.A.** Estudo comparativo entre as provas rápida e lenta de termoresistência para avaliação de sêmen congelado. *Rev Bras Reprod Anim*, v.4, n.3-4, p.6–12, 1980.
- Benvenuto GV, Ferreira HC, Sant`Ana Borges M, Silva LP, Monteiro FM.** Tempos de incubação de amostras de sêmen bovino em teste de termorresistência (TTR). In: 16º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica (CIIC) 2022. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2022. 11p.
- Borges JC.** Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro*. 2008. 70p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2008.
- CBRA.** Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.
- Dimitropoulos E.** La signification du test de la thermoresistance dans l'appréciation de valeur fécondante du sperme congelé. *Ann Méd Vet*, v.4, p.215–224, 1967.
- Graham JK, Mocé E.** Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v.64, n.3, p.492-504, 2005.
- Oliveira LZ, Ribeiro LB, Silva LGT, Oliveira CS, Dias EAR, Campanholi SP, Campos CC, Oliveira MV, Monteiro FM.** Assessment of different *in vitro* sperm challenges and *in vivo* fertility of bovine semen batches. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.54, n.3, p.264-276, 2017.
- Sellem E, Broekhuijse MLWJ, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen EPC.** Use of combinations of *in vitro* quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology*, v.84, p.1447-1454, 2015.
- Silva MR.** Taxa de gestação e avaliação de sêmen congelado/descongelado de touros da raça Nelore utilizando testes convencionais e de adesão *in vitro* de espermatozoides à zona pelúcida de ovócitos bovinos imaturos, 2000. 75p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2000.
- Silva CS, Costa e Silva EV, Dode MAN, Cunha ATM, Garcia WR, Sampaio BFB, Silva JCB, Vaz FEM, Kerns K, Sutovsky P, Nogueira E.** Semen quality of Nelore and Angus bulls classified by fertility indices and relations with field fertility in fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*, v.212, p.148–

156, 2023.

Siqueira JB, Guimarães JD, Costa EP. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. Rev Bras Zootec, v.36, p.387-395, 2007.

Talini R, Kozicki LE, Gaievski FR, Polo G, Lima LGF, Santiago J, Segui MS, Weiss RR, Galan TGB. Bovine semen thermoresistance tests and their correlation with pregnancy rates after fixed-time artificial insemination. Arq Bras Med Vet Zootec, v.71, n.6, p.2085-2092, 2019.

Vianna FP, Papa FO, Zahn FS, Melo CM, Dell'Aqua Jr. JA. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. Anim Reprod Sci, v.113, p.279-282, 2009.
