

## INFLUÊNCIA DA CINÉTICA ESPERMÁTICA SOBRE A TAXA DE PREENHEZ NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BOVINOS

(Influence of sperm kinetics on pregnancy rate in fixed-time artificial inseminations in cattle)

Myrian Megumy Tsunokawa HIDALGO<sup>1</sup>; Ana Beatriz Marques de ALMEIDA<sup>1</sup>; Fábio Lucas Zito de MORAES<sup>2</sup>; Beatriz Canabrava GARRIDO<sup>1</sup>; Maria Isabel Mello MARTINS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR. CEP: 86.057-970; <sup>2</sup>Médico Veterinário autônomo.

\*E-mail: [imartins@uel.br](mailto:imartins@uel.br)

### ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the influence of hyperactivated sperm kinetics on pregnancy rate in IATF. Two experimental groups were established, based on the results of the semen analysis in the CASA system: groups of bulls with hyperactivated sperm (N = 10; HIPER) and bulls with non-hyperactivated sperm (N = 14; N HIPER). Differences between groups were estimated by the t test, and a significance level <5% was considered. Higher values for the variables were identified in the HIPER group: VAP; VSL; VCL; ALH; RAPID cells and SLOW cells. On the other hand: BCF; STR; LIN; WOB and MEDIUM cells, which had higher values in the N HIPER group. No difference was found for the pregnancy rate variable between groups (p=0.454). Therefore, although the CASA system is an objective method of analysis, we can consider that it alone is not sufficient to predict seminal fertility, but when associated with other techniques such as: specific software and multivariate statistics that identify subpopulations, it makes it an important methodology for assessing semen quality.

**Key words:** Spermatozoa; sperm hyperactivation; CASA system; bulls.

### INTRODUÇÃO

O Brasil detém o maior rebanho bovino comercial do mundo com 221,81 milhões de cabeças, observando-se, sobretudo, um crescimento contínuo nos últimos anos. Esse crescimento é devido à nutrição e a utilização cada vez maior de biotécnicas reprodutivas (IBGE, 2018). Das biotécnicas utilizadas, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) se destaca, pois a implementação dessa técnica resulta em melhoria dos índices reprodutivos, redução do intervalo entre partos, aumento da padronização de lotes de bezerros, concentração do nascimento e desmame nas melhores épocas do ano e permite um melhor controle do rebanho (BARUSELLI *et al.*, 2017).

Neste contexto, a avaliação da fertilidade se tornou fundamental para a eficiência reprodutiva e baseia-se principalmente na análise do sêmen após a descongelação usando parâmetros convencionais, como motilidade espermática, morfologia, viabilidade, integridade de membrana e acrossoma (KATHIRAVAN *et al.*, 2011). Embora estas avaliações sejam fundamentais para a análise andrológica de rotina, a análise da motilidade espermática é crucial na seleção de um ejaculado. Assim, a partir dos parâmetros avaliados pela análise computadorizada do sêmen (Computer-assisted sperm analysis- CASA) é possível aferir características cinéticas individuais dos espermatozoides. Desta forma, é possível avaliar células espermáticas em situação hiperativada de uma maneira indireta ao analisar a amplitude

do movimento lateral de cabeça (ALH), velocidade curvilínea (VCL) e linearidade (LIN) (SUAREZ, 2008). Estudos de Marquez e Suarez, (2007) indicam hiperatividade espermática quando os resultados apresentam, simultaneamente:  $ALH > 7\mu\text{m}$ ,  $VCL > 80\mu\text{m/s}$  e  $LIN \leq 65\%$ .

De fato, vários fatores inerentes de qualidade do sêmen podem afetar os resultados dentro de um programa de biotecnologia de inseminação artificial em tempo fixo. Desta forma, o objetivo deste estudo foi pesquisar os parâmetros cinéticos indicativos da hiperatividade espermática e avaliar qual a sua influência sobre a taxa de prenhez na IATF em bovinos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Dados da inseminação artificial em tempo fixo

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UEL, Nº 22459.2018.38). Foram compilados dados da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) com resultados da taxa de prenhez, obtidos a partir do histórico da estação de monta entre os meses de setembro de 2017 a março de 2018 de quatro propriedades atendidas por médico veterinário autônomo. Em todas as propriedades os animais eram mantidos em pasto *Uruchola brizantha*, suplementados com sal mineral e livre acesso à água. As fêmeas (N= 1911) apresentavam idade entre 2 e 10 anos e ECC médio de 2,93 (min: 2,5; máx: 4), em uma escala de 1 a 5 (onde 1: magra e 5: obesa), e foram submetidas ao mesmo protocolo de IATF, inseminadas e avaliadas pelo mesmo técnico. O protocolo hormonal incluiu três tratamentos, iniciados em um dia aleatório do ciclo estral.

No dia 0 (D0), foi inserido um dispositivo intravaginal contendo 1,2g de progesterona (P4) (Fertilcare Implante 1200<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), associado à aplicação de 2mg de benzoato de estradiol (Fertilcare Sincronização<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), por via intramuscular. No dia 8 (D8), o dispositivo de P4 foi removido e juntamente com 2mL de cloprostenol sódico (Estron- cloprostenol<sup>®</sup>, Agener União Saúde Animal, São Paulo, Brasil) foram administrados; 0,5mg de cipionato de estradiol (CE) (Fertilcare Ovulação<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (Folligon<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), por via intramuscular. A inseminação artificial foi realizada no dia 10 (D10), a partir de 48 horas após a remoção do dispositivo P4 e o diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia transretal (Aloka SSD-500<sup>®</sup>, 5,0 MHz), 30 dias após a IATF.

### Seleção dos touros e análise do sêmen

Foram avaliadas 24 doses de sêmen congelado de touros, das raças Nelore (n=15) e Angus (n= 9) sendo uma partida (250 $\mu\text{L}$ ) de cada touro. A determinação dos grupos de touros com espermatozoides hiperativados (N=10; HIPER) e touros com espermatozoides não hiperativados (n=14; N HIPER) foi estabelecido a partir dos resultados das análises do sêmen no sistema CASA, sendo considerado grupo HIPER os parâmetros com  $ALH > 7\mu\text{m}$ ,  $VCL > 80\mu\text{m/s}$  e  $LIN \leq 65\%$ , segundo Marquez e Suarez (2007) e grupo N HIPER os parâmetros cinéticos fora desse padrão. A média da taxa de prenhez para cada touro foi obtida por meio dos resultados compilados dos diagnósticos realizados por ultrassom 30 dias após as inseminações.

A análise computadorizada da cinética espermática foi realizada no equipamento IVOS<sup>®</sup> (Hamilton-Thorne IVOS, Beverly, MA, USA), utilizando o *setup* para bovinos. Os parâmetros analisados foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), amplitude lateral da cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e taxa de oscilação (WOBBLE, %). Também foi avaliada a proporção de células rápidas, médias, lentas e estáticas dentro da amostra. Todas as análises de sêmen foram realizadas pelo mesmo técnico.

### **Análise estatística**

Para avaliar o efeito das variáveis, como: escore de condição corporal (ECC) e categoria das vacas (novilhas ou vacas, primíparas ou múltiparas); raça dos touros; fazenda e o efeito do touro sobre a taxa de gestação, foi utilizado o modelo linear generalizado. A variável inseminador não foi considerada pois os protocolos hormonais, inseminações e diagnósticos gestacionais foram executados pelo mesmo técnico. A fim de comparar a média dos parâmetros de cinética espermática entre os grupos de touros hiperativados e não hiperativados, foi utilizado o teste T. Os resultados foram apresentados com estimativas de médias, desvio padrão e considerado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Ao avaliar o efeito das variáveis: raça animal, escore de condição corporal (ECC), categoria das fêmeas (novilhas ou vacas, primíparas ou múltiparas) e fazenda, para determinação da eficiência reprodutiva do rebanho, foi observado apenas influência do touro sobre a taxa de prenhez ( $p = 0,003$ ). No grupo HIPER, foram identificados valores superiores para as variáveis: velocidade média do trajeto (VAP;  $p < 0,001$ ); velocidade progressiva (VSL;  $p = 0,022$ ); velocidade curvilínea (VCL;  $p < 0,001$ ); amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH;  $p < 0,001$ ); células com velocidade rápida (RAPID;  $p = 0,042$ ) e células com velocidade lenta (SLOW;  $p = 0,032$ ).

Por outro lado, a frequência de batimento flagelar (BCF;  $p = 0,031$ ); retilinearidade (STR;  $p < 0,001$ ); linearidade (LIN;  $< 0,001$ ); wobble (WOB;  $p < 0,001$ ) e células com velocidade média (MEDIUM;  $p = 0,029$ ), tiveram valores superiores no grupo N HIPER. Estudos prévios indicam que maiores percentuais de células RAPID e ALH, apresentam maior resistência à criopreservação (KATHIRAVAN *et al.*, 2011; SHOJAEI *et al.*, 2012), bem como, já foi observado maior sucesso reprodutivo com espermatozoides com velocidade rápida e altos valores de VCL (SHIBAHARA *et al.*, 2004). Resultados semelhantes também foram descritos por Nagy *et al.* (2015) e Inanç *et al.* (2018), no qual foram identificados que variáveis como: VAP, VSL, VCL e a ALH apresentaram correlação positiva com taxa de fertilização nos índices reprodutivos utilizando doses de sêmen bovino congeladas. Ademais, um estudo à campo utilizando doses hiperativadas e não hiperativadas de touros, revelaram maiores taxas de gestação por IA com sêmen hiperativado em vacas com ovulação precoce (PFEIFER *et al.*, 2018).

No presente estudo, apesar das diferenças encontradas para alguns parâmetros entre os grupos ( $p < 0,05$ ), não foi encontrado diferença para a variável taxa de prenhez nos grupos HIPER (805/408; 50,72%) e N HIPER (1,106/ 590,05; 53,35%); ( $p = 0,454$ ). Neste caso, a falta de explicações acerca da diferença no potencial de fertilidade de uma partida de sêmen pode ser em função de atributos espermáticos não avaliados (GARCÍA-ÁLVAREZ *et al.*, 2014).

É importante considerar que o ejaculado do mamífero é heterogêneo, ou seja, é composto por diferentes subpopulações espermáticas, que apresentam respostas variadas quanto aos padrões de motilidade (QUINTERO-MORENO *et al.*, 2003). Portanto, embora o sistema CASA permita a identificação da cinética das células espermáticas e o registro individual de sua trajetória, se forem considerados os valores médios da cinética espermática, presume-se que o ejaculado é uniforme, causando perda de informações importantes (BARBAS *et al.*, 2018).

## CONCLUSÕES

Conclui-se que, a análise computadorizada pelo sistema CASA é amplamente utilizada como método objetivo de análise, mas não foi suficiente para prever a fertilidade seminal, e deve ser associado com outros métodos de avaliação mais acurados, para fornecer explicações acerca da diferença no potencial de fertilidade.

## REFERÊNCIAS

- BARBAS, J.P.; LEAHY, T.; HORTA, A.E.; GARCÍA-HERREROS, M. Sperm kinematics and subpopulational responses during the cryopreservation process in caprine ejaculates. *Cryobiology*, v.82, n.2, p.137–147, 2018.
- BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; COLLI, M.H.A.; ELLIFF, F.M.; SÁ FILHO, M.F.; VIEIRA, L.; FREITAS, B.G. Timed artificial insemination: Current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. *Animal Reproduction*, v.14, n.3, p.558–571, 2017.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; DEL OLMO, E.; JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; ANEL-LÓPEZ, L.; GARDE, J.J.; SOLER, A.J. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support in vitro capacitation and fertilisation. *Reproduction, Fertility and Development*, v.26, n.5, p.725–732, 2014.
- INANÇ, M.E.; ÇIL, B.; TEKIN, K.; ALEMDAR, H.; DAŞKIN, A. The combination of CASA kinetic parameters and fluorescein staining as a fertility tool in cryopreserved bull semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v.42, n.5, p.452–458, 2018.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema de Recuperação Automática (SIDRA). 2018.
- KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; KARTHIKEYA, G.; RENGARAJAN, K.; KADIRVEL, G. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using

Computer-Aided System - A Review. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, n.1, p.165–172, 2011.

MARQUEZ, B.; SUAREZ, S.S. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca<sup>2+</sup> influx. *Biology of Reproduction*, v.76, n.4, p.660–665, 2007.

NAGY, Á.; POLICHRONOPOULOS, T.; GÁSPÁRDY, A.; CSEH, S. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Veterinaria Hungarica*, v.63, n.3, p.370–381, 2015.

PFEIFER, L.F.M.; OLIVERIA JÚNIOR, J.S.; POTIENS, J.R. Effect of sperm kinematics and size of follicle at ovulation on pregnancy rate after timed AI of beef cows. *Animal Reproduction Science*, v.20, n.1, p.55-62 2018.

QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; TERESA RIGAU, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, v.59, n.9, p.1973–1990, 2003.

SHIBAHARA, H.; OBARA, H.; AYUSTAWATI; HIRANO, Y.; SUZUKI, T.; OHNO, A.; TAKAMIZAWA, S.; SUZUKI, M. Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. *International Journal of Andrology*, v.27, n.2, p.63–68, 2004.

SHOJAEI, H.; KROETSCH, T.; WILDE, R.; BLONDIN, P.; KASTELIC, J.P.; THUNDATHIL, J.C. Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. *Theriogenology*, v.77, n.5, p.940–951, 2012.

SUAREZ, S.S. Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update*, v.14, n.6, p.647–657, 2008.