

Qualidade do sêmen criopreservado e fertilidade de fêmeas bovinas em programas de IATF: dados preliminares

Camile Sanches Silva^{1}, Walvonvitis Baes Rodrigues², José Roberto Potiens³, Juliana Corrêa Borges Silva⁴, Eduardo Antonio de Almeida Rossignolo¹, Fernanda Battistotti Barbosa¹, Eliane Vianna da Costa e Silva¹, Eriklis Nogueira⁴*

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de correlacionar os distintos métodos de avaliações laboratorial da criopreservação espermática com a taxa de prenhez de vacas zebuínas submetidas a protocolos de IATF, através de análise de regressão logística múltipla entre prenhez e parâmetros avaliados individualmente. Foram realizadas 19 análises de rotina laboratoriais de aspectos físicos, funcionais e morfológicos por meio de meios subjetivos, CASA e citometria de fluxo em amostras de sêmen de 20 touros utilizados nas 1.542 vacas Nelore submetidas à IATF. Foi observado o efeito da VCL (velocidade curvilínea), velocidade retilínea (VSL), linearidade (LIN) e concentração espermática (mL) na probabilidade de prenhez de vacas Nelore submetido à IATF. Os outros parâmetros avaliados não tiveram efeito na taxa de prenhez.

Palavras-chave: CASA. Citometria de fluxo. Vaca.

Quality of cryopreserved semen and fertility of cows in IATF programs: preliminary data

Abstract: The aim was to correlate different methods of laboratorial evaluation of semen post-thawing with the pregnancy rate of zebu cows submitted to FTAI, through logistic regression analysis between pregnancy and individually assessed parameters. Nineteen laboratory routine analyzes of physical, functional and morphological aspects were performed by subjective means, CASA and flow cytometry in semen samples from 20 bulls used in the 1,542 Nelore cows submitted to FTAI. The effect of VCL (curvilinear velocity), rectilinear velocity (VSL), linearity (LIN) and sperm concentration (mL) on the probability of pregnancy of Nelore cows submitted to FTAI was observed. The other parameters evaluated had no effect on the pregnancy rate.

Keywords: CASA. Flow cytometry. Cow.

Introdução

Apesar da metodologia de criopreservação espermática ter se tornado um procedimento habitual na indústria de biotecnologia reprodutiva, admite-se que a maioria dos protocolos utilizados resulta em considerável quantidade de espermatozoides que não sobrevivem ao processamento ou falham em alguma etapa da fecundação (NAGY et al., 2004).

A influência da qualidade do sêmen criopreservado em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) sobre a taxa de prenhez é expressiva, ainda que se utilizem amostras submetidas a testes laboratoriais simples e que atendam a padrões mínimos de qualidade (ANDERSSON et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2011a, 2011b)

A correlação de testes laboratoriais rotineiramente realizados, tais como: exames imediatos do sêmen, concentração e morfologia espermática, teste de termoresistência, análises computadorizadas do sêmen (ISLAM et al., 2017), testes funcionais, de integridade acrossoma e de membrana, bem como, a citometria de fluxo (GLIOZZI et al., 2007), com a taxa de prenhez à IATF são contraditórios, potencialmente em decorrência do número de fêmeas inseminadas, variações ambientais e alterações estruturais nos diversos compartimentos dos espermatozoides.

¹ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

² Médico-Veterinário, Profissional Liberal.

³ Seleon Indústria e Comércio, 18690-000, Itatinga, São Paulo.

⁴ Embrapa Pantanal, Caixa Postal 109, 79320-900, Corumbá, Mato Grosso do Sul.

* medvetcamile@gmail.com

Deste modo, o trabalho foi conduzido com objetivo de correlacionar diferentes métodos de avaliação seminal com a taxa de prenhez de vacas zebuínas submetidas a protocolos de IATF.

Material e Métodos

Para realização dos testes laboratoriais, foram selecionadas amostras de partidas de sêmen de 20 touros, igualmente distribuídos, das raças Nelore e Angus, utilizadas na IATF de 1542 vacas Nelore, nulíparas e pluríparas, oriundas de propriedades localizadas no estado de Mato Grosso do Sul. O protocolo de IATF incluiu: D0: inserção do dispositivo de 1g progesterona (Sincrogest®) associado à 2mg de benzoato de estradiol, IM (Estrogin®); D8: retirada do dispositivo associado à 0,150 mg de d-cloprostenol, IM (Prolise®), 0,5 mg de cipionato de estradiol (ECP®) e 300UI de gonadotrofina coriônica equina (Novormon®); D10: inseminação artificial, realizada por cinco inseminadores de experiência comprovada e utilizando sêmen descongelado em descongelador automático à 36°C. O diagnóstico de gestação foi obtido por ultrassonografia transretal, 30 dias após a IATF.

Para determinação da qualidade espermática, avaliou-se motilidade e vigor pós-descongelamento, concentração e análise morfológica, teste hiposmótico (HOS) e teste de termo-resistência rápido (TTR) de acordo com CBRA (2013).

A análise computadorizada para avaliação da cinética espermática foi determinada pelo equipamento Computer-assisted semen analyse (CASA), modelo Ivos-Ultimate - Hamilton Thorne Biosciences, previamente ajustado (setup) para análise de sêmen bovino. Foram utilizados dois microlitros de sêmen e selecionados no mínimo sete campos para a leitura e análise dos parâmetros: motilidade total (%; MT), motilidade progressiva (%; MP), velocidade média ($\mu\text{m/s}$; VAP), velocidade retilínea ($\mu\text{m/s}$; VSL), velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$; VCL), amplitude lateral de cabeça (μm ; ALC), linearidade (%; LIN), retilinearidade (%; STR).

A integridade estrutural da membrana plasmática e polarização mitocondrial foram avaliadas por citometria de fluxo, utilizando, respectivamente, as sondas fluorescentes PI (iodeto de propídeo) e JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianine iodide), no aparelho EasyCyte IMV France.

A gestação foi expressa de forma binária (prenha ou vazia) e realizada a análise de regressão logística múltipla, admitindo-se o nível de significância de 5% e análise de correlação entre as variáveis (fertilidade da partida e resultados dos testes laboratoriais), com os touros incluídos no modelo, assim como inseminador e fazenda, e quando não significativos, excluídos. Os dados foram analisados através do Statistical Analysis System 9.1.3 (CASAGRANDE et al., 1979).

Resultados e Discussão

A análise de regressão logística apresentou concordância de 54,9% e probabilidade estimada de distinguir a probabilidade de prenhez, considerando no modelo logístico como significativas as variáveis velocidade curvilínea (VCL; $P=0,008$), velocidade retilínea (VSL; $P=0,015$), linearidade (LIN; $P=0,037$) e a concentração de espermatozoides/mL ($P=0,0428$). A taxa de prenhez entre touros variou de 22,9 a 59,4% ($P=0,016$).

Tabela 1. Variáveis de qualidade seminal pós-descongelamento (média e desvio padrão). MOT= motilidade subjetiva; ConcTT = concentração total; MOTp= motilidade progressiva; VCL= velocidade curvilínea; VSL=velocidade linear; VAP= velocidade de trajeto; LIN=índice de linearidade e STR=índice de retilinearidade; ALC=amplitude lateral de cabeça.

Variáveis	Média \pm DP
MOT (%)	48,53 \pm 8,76
Vigor (0-5)	3,21 \pm 0,61
Def Totais (%)	11,29 \pm 7,76
Conc/mL (sptz $\times 10^6$)	54,97 \pm 23,31
Concvv/dose (sptz $\times 10^6$)	7,53 \pm 2,81
HOS (céls integras, %)	49,00 \pm 9,85
MOT-TTR (%)	15,27 \pm 9,22
Vigor-TTR (0-5)	2,13 \pm 0,94
HOS (integras-%)	19,79 \pm 9,78
<i>Variáveis - análise computadorizada</i>	
MOTtt (%)	36,99 \pm 11,83
MOTp (%)	28,22 \pm 8,61
VCL($\mu\text{m/s}$)	155,77 \pm 27,05

VSL(µm/s)	79,95 ± 10,56
VAP(µm/s)	94,16 ± 12,15
LIN (%)	52,02 ± 6,12
STR (%)	84,45 ± 4,79
ALC (µm)	6,95 ± 1,36
<i>Citometria de fluxo</i>	
Integridade de membrana (PI) - %	47,18 ± 13,63
Potencial de membrana mitocondrial (%)	47,05 ± 10,55

Fonte: Elaborado pelos autores.

VCL e VSL apresentaram curva ascendente, sendo que, taxas de gestação acima de 50% foram preditas quando a velocidade foi superior a 140 e 65 µm/s (Fig 1A e 1B, respectivamente). A concentração espermática vem sendo discutida como um fator de relevância desde os primeiros trabalhos com inseminação artificial, ainda no método tradicional (CASAGRANDE et al., 1979). A concentração de espermatozoides/mL apresentou uma curva em que as taxas de gestação mais altas apresentaram-se entre 40 a 80 milhões de espermatozoides/mL, diferentemente de resultados de Crespiho et al. (2014). Em relação a LIN, houve efeito negativo, com maiores taxas de gestação encontradas com linearidade mais baixa.

Das 19 variáveis avaliadas, apenas a concentração de espermatozoides/mL, e as variáveis avaliadas pelo CASA (VCL, VSL e LIN), apresentaram algum efeito sobre a probabilidade de prenhez em vacas submetidas a IATF, assim, novos estudos estão em andamento buscando avaliar associações entre parâmetros laboratoriais e fertilidade, visando melhorar a predição de fertilidade em relação à avaliação de partidas de sêmen pós-descongelamento.

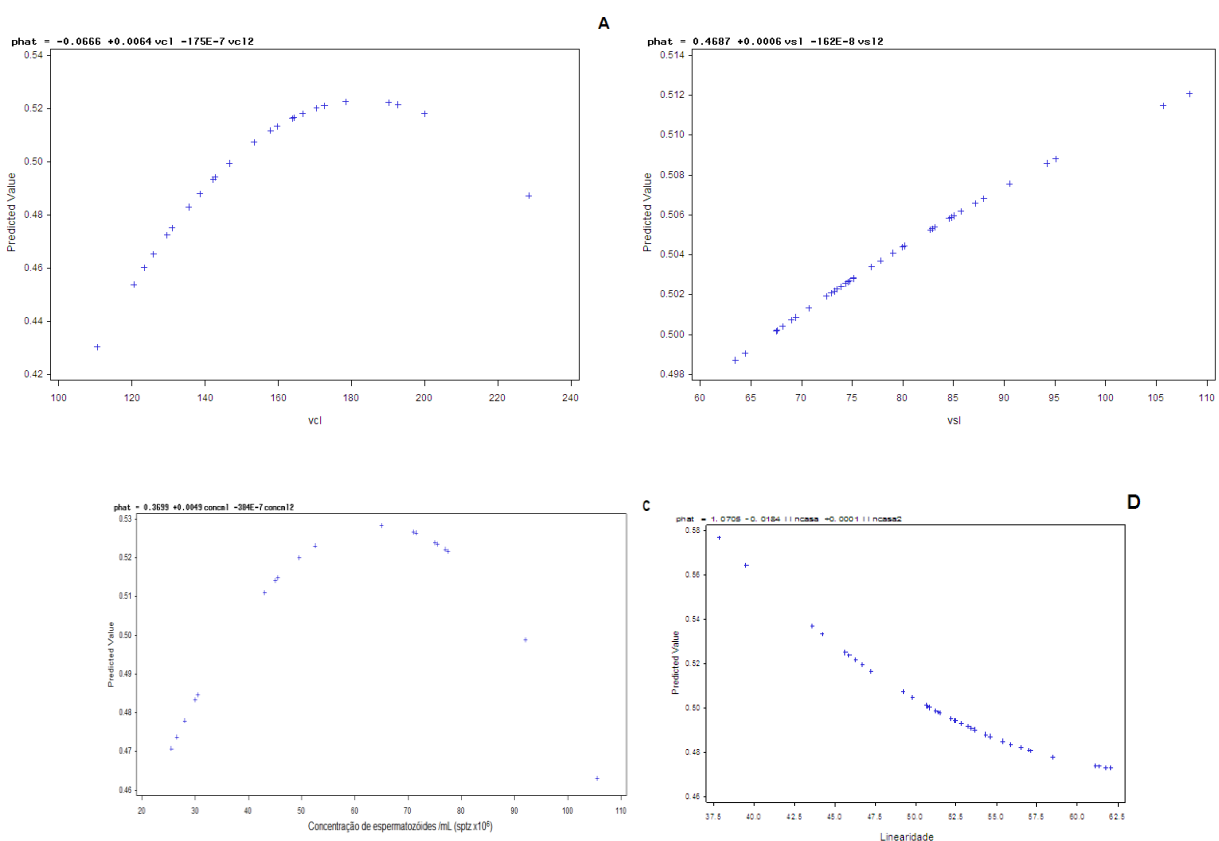


Figura 1. Relação entre: VCL (velocidade curvilínea) (A), velocidade retilínea (VSL) (B), concentração espermática/mL da dose (C), linearidade (LIN) (D), e a probabilidade de gestação de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF. Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

A velocidade curvilínea, velocidade retilínea, linearidade e concentração espermática/mL afetaram a probabilidade de gestação de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF. Novos estudos, avaliando a associação de parâmetros e taxas de prenhez, estão em andamento buscando melhorar a predição da fertilidade de partidas de sêmen congelado.

Agradecimentos

A FUNDECT e a Capes pela concessão de bolsas de doutorado e Pós-doutorado e a EMBRAPA pelo apoio financeiro para pesquisa.

Referências

- ANDERSSON, M.; TAPONEMA, J.; KOSKINENA, E.; DAHLBOM, M. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. **Theriogenology**, v. 61, n. 7, p. 1583-1588, 2004.
- CASAGRANDE, J. F.; PINHEIRO, L. E. L.; ALMEIDA, C. A.; FERRAZ, J. B. S. Patologia espermática agrupada segundo BLOM (1972) na avaliação de sêmen para conelação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 3, n. 2, p. 19-23, 1979.
- CBRA - Colegio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.
- CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; SA FILHO, M. F.; GUASTI, P. N.; DELLAQUA JUNIOR, J. A.; VASCONCELOS, J. L. M.; NOVAES, J. L. C.; MARTINS JUNIOR, A. The influence of insemination dose on pregnancy per fixed-time artificial insemination in beef cows is affected by semen extender. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 1, p. 3-10, 2014.
- GLIOZZI, T. M.; TURRI, F.; MANES, S.; CASSINELLI, C.; PIZZI, F. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. **The Animal Consortium**, p. 1-8, 2017.
- ISLAM, M. R.; HUSAIN, S. S.; HOQUE, M. A.; TALUKDER, M. K.; RAHMAN, M. S.; ALI, M. Y. Computer assisted sperm analysis of Brahman crossbred breeding bull semen. **Bangladesh Journal of Animal Science**, v. 46, n. 1, p. 1-9, 2017.
- NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 80, n. 3-4, p. 225-235, 2004.
- NOGUEIRA, E.; SILVA, A. S.; DIAS, A. M.; ITAVO, L. C. V.; BATISTOTE, E. **Taxa de prenhez de vacas nelores submetidas a protocolos de IATF no Pantanal de MS**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011a. 5 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 97)
- NOGUEIRA, E.; SILVA, A. S.; MARQUES JUNIOR, H. R.; NOGUEIRA, R. J.; BORGES, J. C. **Taxa de prenhez de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF no Planalto Boliviano**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011b. 5 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 101)