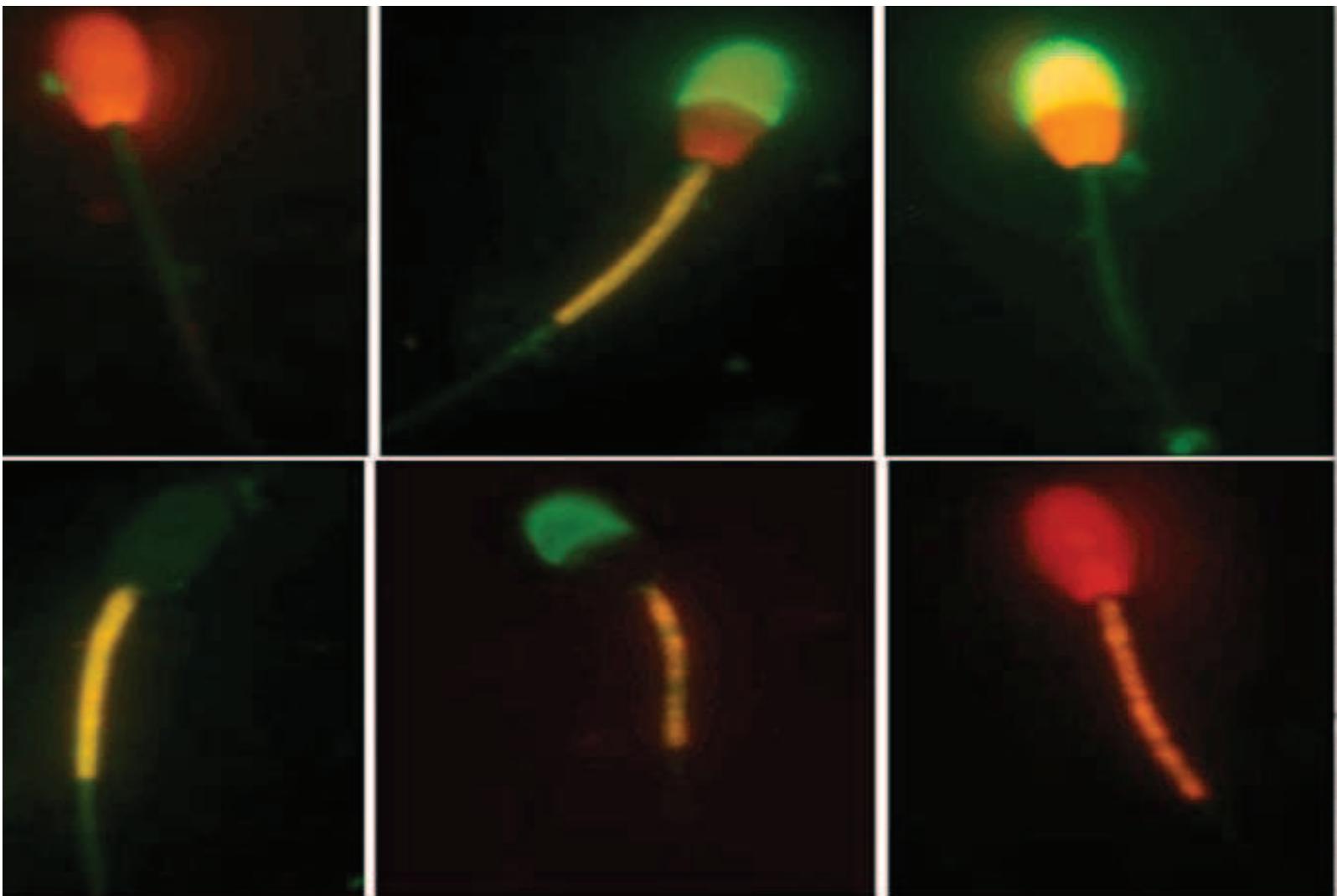


2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA) ANAIS



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pantanal
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 146

2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA) ANAIS

Juliana Corrêa Borges Silva
Luiz Alfredo Garcia Deragon
Marco Antônio Carstens Mendonça

Organizadores

Embrapa Pantanal
Corumbá, MS
2017

Exemplares dessa publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pantanal

Rua 21 de Setembro, 1880, CEP 79320-900, Corumbá, MS

Caixa Postal 109

Fone: (67) 3234-5800

Fax: (67) 3234-5815

Home page: www.embrapa.br/pantanal

Email: www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Unidade Responsável pelo conteúdo

Embrapa Pantanal

Comitê Local de Publicações da Embrapa Pantanal

Presidente: *Ana Maria Dantas de Maio*

Secretária: *Marilisi Jorge da Cunha*

Membros: *Ana Helena B. M. Fernandes*

Fernando Rodrigues Teixeira Dias

Juliana Corrêa Borges Silva

Márcia Furlan N. Tavares de Lima

Sandra Mara Araújo Crispim

Viviane de Oliveira Solano

Supervisora editorial: *Ana Maria Dantas de Maio*

Tratamento de ilustrações: *Marilisi Jorge da Cunha*

Editoração eletrônica: *Marilisi Jorge da Cunha*

Foto da capa: ABMVZ, v. 62, n.3, Belo Horizonte, June 2010.

1ª edição

Formato digital (2017)

Todos os direitos reservados.

**A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pantanal

Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA) (2. : 2017 : Uberlândia, MG).

Anais da 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA), Uberlândia, MG, 09 a 10 de junho de 2017 [recurso eletrônico] / organizado por Juliana Corrêa Borges Silva ... [et al.]. – Dados eletrônicos. – Corumbá: Embrapa Pantanal, 2017.

201 p. (Documentos / Embrapa Pantanal, ISSN 1981-7223 ; 146).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: <www.embrapa.br/pantanal/publicacoes>

Título da página da Web (acesso em 26 de set. 2017)

1. Reprodução animal. 2. Andrologia animal. 3. Pesquisa. I. Silva, Juliana Borges da., org. II. Deragon, Luis Alfredo Garcia, org. III. Mendonça, Marco Antônio Carstens, org. VI. Embrapa Pantanal. Série.

CDD 636.082 (21. ed.)

© Embrapa 2017

Categorização computadorizada da motilidade de espermatozoides criopreservados de touros compostos após desafio térmico *in vitro*

Daniela Botta^{1}, Rubens Paes de Arruda², Carla Patrícia Teodoro de Carvalho², Narian Romanello¹, Messy Hannear de Andrade Pantoja¹, Andrea do Nascimento Barreto¹, Amanda Prudêncio Lemes³, Alessandro Giro¹, Ana Beatriz Moura⁴, Alexandre Rossetto Garcia⁵*

Resumo: As amostras de sêmen criopreservado de 5 touros foram descongelados e submetidos a desafio térmico usando incubação a 38,0°C (Tratamento 1) e 39,5°C (Tratamento 2). As amostras foram analisadas imediatamente após a descongelação (M0) e após 1 hora de incubação (M1). As seguintes variáveis foram determinadas: motilidade total, porcentagem de espermatozoides com movimento rápido, médio ou lento e porcentagem de espermatozoides estáticos. As análises foram feitas usando o Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA). Os dados foram submetidos à análise de variância e os meios foram comparados utilizando o teste de Tukey ($P < 0,05$). A incubação do sêmen coletado a 38,0°C não influenciou a motilidade total, e a porcentagem de espermatozoides com movimento rápido, médio, lento. Não foi observada diferença significativa entre M0 e M1 a 38,0°C. Sob 39,5°C, todas as variáveis responderam de forma semelhante, com diferença significativa entre os tempos de avaliação. Assim, a incubação de 1 hora a 38°C, não afetou a motilidade total e suas categorizações, enquanto a incubação a 39,5°C por 1 hora reduziu significativamente os padrões de motilidade.

Palavras-chave: Canchim. CASA. Estresse térmico.

Computerized categorization of motility of cryopreserved spermatozoa of composite bulls after *in vitro* thermal challenge

Abstract: Samples of cryopreserved semen of 5 composite bulls were thawed and subjected to thermal challenge using incubation at 38.0°C (Treatment 1) and 39.5°C (Treatment 2). Samples were evaluated immediately after thawing (M0) and after 1 hour of incubation (M1). The following variables were determined: total motility, percentage of spermatozoa showing fast, medium or slow movement, and percentage of static spermatozoa. Analyses were done using Computerized System of Semen Analysis (CASA). Data were submitted to analysis of variance and means were compared using Tukey test ($P < 0.05$). Despite the semen donor, incubation at 38.0 °C did not influence the total motility, the percentage of fast, medium, slow and percentage of static spermatozoa. No significant difference was observed between M0 and M1 at 38.0°C. Under 39.5°C all variables responded similarly, with significant difference between the evaluation times. Thus, incubation for 1 hour at 38°C did not affect the total motility and their categorizations, while incubation at 39.5°C for 1 hour significantly reduced the motility patterns.

Keywords: Canchim. CASA. Thermal stress.

Introdução

É indiscutível que a criopreservação do sêmen de maneira adequada é essencial para o avanço do uso de diversas biotécnicas de reprodução assistida (PAPA et al., 2000) e para o melhoramento animal em diferentes espécies. Quando comparado com o sêmen a fresco ou refrigerado, o sêmen criopreservado apresenta índices de fertilidade menores. Este fato pode ser explicado pelos desafios enfrentados pela célula durante os processos de congelamento e descongelamento (WATSON, 2000). Os padrões de motilidade expressos no sêmen são influenciados pelas

¹ Universidade Federal do Pará, Caixa Postal, 68746-360, Castanhal, Pará.

² Universidade de São Paulo, Caixa Postal, 13635-900, Pirassununga, São Paulo.

³ Universidade Estadual Paulista, Caixa Postal, 14884-900 Jaboticabal, São Paulo.

⁴ Universidade Federal Fluminense, Caixa Postal, 24220-900, Niterói, Rio de Janeiro.

⁵ Embrapa Pecuária Sudeste, Caixa Postal 339, 13560-970, São Carlos, São Paulo

* dani_botta@hotmail.com

características individuais dos espermatozoides, sendo estas células passíveis de serem classificadas em subpopulações, de acordo com a categorização da motilidade apresentada. Cada subpopulação tem a capacidade de responder de forma distinta aos desafios enfrentados naturalmente ou induzidos no ambiente (FAROOQ et al., 2017). Considerando a importância dessa variável como indicador de potencial fertilidade, o objetivo do trabalho foi avaliar de modo automatizado as categorias de motilidade dos espermatozoides do sêmen criopreservado de diferentes touros compostos, após desafio térmico realizado in vitro.

Material e Métodos

Sêmen de 5 touros da raça Canchim (*Bos taurus* x *Bos indicus*) foi coletado por vagina artificial, diluído em citrato-gema e criopreservado (ABUD et al., 2014) em palhetas plásticas de 0,5 mL. Foram criopreservados 4 ejaculados por touro, totalizando 20 ejaculados. As amostras seminais foram descongeladas a 37°C durante 30 segundos, sendo posteriormente transferidas para microtubos previamente aquecidos. O sêmen foi incubado em laboratório, sob duas temperaturas distintas, que compuseram os tratamentos: incubação a 38,0°C (Tratamento 1) ou a 39,5°C (Tratamento 2). O tempo total de incubação foi de 1 hora. As amostras passaram por avaliação logo após a descongelação (Momento 0 = M0) e após a incubação (Momento 1 = M1). Foram realizadas avaliações de motilidade por meio do Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA), realizadas com o equipamento HTM-IVOS (versão 12.3, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, Massachusetts, EUA). Foram analisadas a motilidade total (%) e determinadas as subpopulações de espermatozoides com movimento rápido, médio, lento e estático (%). O set up adotado foi previamente ajustado para a espécie bovina. Para a realização das análises, a concentração espermática foi previamente ajustada para 40 milhões de espermatozoides/mL por diluição em meio Talp, sendo posteriormente depositada uma gota de 10µL de sêmen em câmara de leitura (Makler Counting Chamber, SEFI Medical Instruments LTD, Haifa, Israel). Em cada amostra, foram selecionados 5 campos para a leitura e análise. A análise estatística foi realizada de modo descritivo, e compreendeu também as análises de normalidade dos resíduos, análise de variância e teste de comparação de médias (Teste de Tukey). O nível de significância previamente adotado foi de 5%.

Resultados e Discussão

Os resultados de motilidade total estão apresentados na (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre touros no mesmo momento de avaliação. A temperatura de 38,0°C não determinou diferença significativa ao longo do tempo de incubação, independentemente de touro. Para a temperatura de 39,5°C houve diferença significativa após a incubação, para todos os touros. Nesta temperatura, houve decréscimo da motilidade para valores iguais ou próximos a 0 após a incubação. A queda acentuada na motilidade total após a incubação à temperatura de 39,5°C pode ser decorrente da perda de componentes intracelulares ou de lesões estruturais ocorridas na cauda dos espermatozoides (HARRISON; VICKERS, 1990). A motilidade espermática é dependente das concentrações de ATP, pois o processo de movimentação flagelar requer uma grande demanda de energia. Desta forma, o aumento da temperatura e consequentes lesões em mitocôndrias e axonema pode diminuir a produção de ATP e a motilidade espermática (RODRIGUES-MARTINEZ et al., 1997).

Tabela 1. Médias e desvios-padrão da porcentagem de motilidade total de sêmen criopreservado observada em diferentes touros após a descongelação (M0) e após a incubação por 1 hora (M1) nas temperaturas de 38,0°C e 39,5°C. (a,b) letras minúsculas distintas indicam diferença significativa nas linhas e (A,B) letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa nas colunas (P<0,05).

Touro	38,0°C		39,5°C	
	M0	M1	M0	M1
I	49.0 ± 12.5 ^{Aa}	34.3 ± 10.9 ^{Aa}	44.3 ± 15.5 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
II	55.3 ± 4.9 ^{Aa}	45.0 ± 15.4 ^{Aa}	54.0 ± 1.8 ^{Aa}	0.8 ± 1.5 ^{Ab}
III	54.0 ± 4.8 ^{Aa}	54.8 ± 5.9 ^{Aa}	57.8 ± 8.3 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
IV	53.5 ± 12.7 ^{Aa}	39.8 ± 26.5 ^{Aa}	50.5 ± 12.8 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
V	53.3 ± 6.7 ^{Aa}	42.3 ± 15.7 ^{Aa}	58.3 ± 11.4 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}

Fonte: Elaborado pelos autores.

A categorização da motilidade total está apresentada na Tabela 2. Não houve diferença entre touros para as variáveis estudadas. Sob temperatura de 38,0°C a porcentagem de espermatozoides com movimento rápido após a incubação apresentou diferença significativa para um único touro (Touro I), com diminuição da porcentagem no M1. Para os demais touros, não houve diferença significativa entre M0 e M1. A subpopulação de espermatozoides com movimentos médio, lento e estático não apresentou diferença significativa após a incubação na temperatura de

38,0°C. Quando o sêmen foi incubado na temperatura de 39,5°C houve diferença significativa em todas as subpopulações de todos os ejaculados estudados.

Neste estudo, a motilidade total do sêmen e as subpopulações espermáticas comportaram-se de maneira semelhante, independentemente dos touros avaliados. O tratamento com temperatura mais alta foi capaz de afetar com maior intensidade essas variáveis, prejudicando as características de motilidade de cada touro após a incubação. Os resultados diferem dos apresentados por Muiño et al. (2008), que observaram que temperatura mais alta na descongelação (50,0°C/15seg) favoreceu, após a incubação por 2 horas a 37,0°C, a subpopulação de espermatozoides com movimento rápido e progressivo. Este fato sugere que os danos causados ao espermatozoide são potencializados não somente pelo estresse térmico ao qual o espermatozoide é submetido, mas também pelo tempo em que a célula é mantida sob condição de estresse.

Tabela 2. Médias e desvios-padrão da porcentagem de espermatozoides com movimentos rápido, médio, lento e estáticos, observados em sêmen de diferentes touros após descongelação (M0) e incubação por 1 hora nas temperaturas de 38,0°C ou 39,5°C. A, B letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa nas colunas (P<0,05). a, b letras minúsculas distintas indicam diferença significativa nas linhas (P<0,05).

Touro	38,0°C		39,5°C	
	M0	M1	M0	M1
Movimento Rápido				
I	39.3 ± 11.4 ^{Aa}	22.8 ± 6.7 ^{Ab}	37.8 ± 14.2 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
II	48.8 ± 6.1 ^{Aa}	31.8 ± 21.6 ^{Aa}	49.3 ± 2.2 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
III	46.3 ± 1.5 ^{Aa}	48.3 ± 7.9 ^{Aa}	52.5 ± 7.5 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
IV	47.5 ± 13.0 ^{Aa}	31.0 ± 26.6 ^{Aa}	46.0 ± 13.0 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
V	49.8 ± 5.4 ^{Aa}	38.5 ± 15.6 ^{Aa}	55.3 ± 10.9 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
Movimento Médio				
I	10.3 ± 5.6 ^{Aa}	11.8 ± 5.9 ^{Aa}	6.3 ± 3.9 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
II	6.5 ± 2.6 ^{Aa}	13.3 ± 8.1 ^{Aa}	4.8 ± 1.3 ^{Aa}	0.8 ± 1.5 ^{Ab}
III	7.8 ± 3.6 ^{Aa}	6.5 ± 4.4 ^{Aa}	5.3 ± 2.1 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
IV	6.0 ± 2.7 ^{Aa}	8.8 ± 3.0 ^{Aa}	4.3 ± 1.3 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
V	3.5 ± 1.9 ^{Aa}	3.8 ± 1.0 ^{Aa}	2.5 ± 0.6 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
Movimento Lento				
I	37.8 ± 5.4 ^{Aa}	36.0 ± 8.6 ^{Aa}	33.0 ± 9.9 ^{Aa}	0.8 ± 1.0 ^{Ab}
II	32.5 ± 8.2 ^{Aa}	24.3 ± 7.2 ^{Aa}	30.0 ± 8.6 ^{Aa}	1.0 ± 1.4 ^{Ab}
III	35.5 ± 6.5 ^{Aa}	29.5 ± 8.3 ^{Aa}	30.8 ± 6.4 ^{Aa}	0.5 ± 1.0 ^{Ab}
IV	28.5 ± 7.8 ^{Aa}	27.5 ± 12.8 ^{Aa}	26.5 ± 8.7 ^{Aa}	0.5 ± 0.6 ^{Ab}
V	27.5 ± 4.8 ^{Aa}	26.5 ± 5.5 ^{Aa}	23.8 ± 5.7 ^{Aa}	1.0 ± 2.0 ^{Ab}
Estáticos				
I	13.3 ± 10.0 ^{Aa}	29.8 ± 19.4 ^{Aa}	22.8 ± 22.3 ^{Aa}	99.3 ± 1.0 ^{Ab}
II	12.3 ± 7.8 ^{Aa}	31.0 ± 21.6 ^{Aa}	16.0 ± 10.1 ^{Aa}	98.3 ± 1.5 ^{Ab}
III	10.0 ± 6.4 ^{Aa}	15.8 ± 4.1 ^{Aa}	11.8 ± 4.1 ^{Aa}	99.5 ± 1.0 ^{Ab}
IV	18.0 ± 16.8 ^{Aa}	33.0 ± 30.1 ^{Aa}	23.3 ± 15.2 ^{Aa}	99.5 ± 0.6 ^{Ab}
V	19.5 ± 5.4 ^{Aa}	31.3 ± 20.6 ^{Aa}	18.3 ± 10.6 ^{Aa}	99.0 ± 2.0 ^{Ab}

Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

A incubação do sêmen criopreservado na temperatura de 38,0°C, por 1 hora, manteve a motilidade total e a porcentagem de espermatozoides com movimento rápido, médio, lento e estáticos. Porém, a incubação a 39,5°C por 1 hora prejudicou intensamente a motilidade total dos ejaculados.

Referências

ABUD, C. O. G.; ABUD, L. J.; CARVALHO NETO, J. de O.; DODE, M. A. N.; SERENO, J. R. B.; MARTINS, C. F. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 32-37, 2014.

- FAROOQ, U.; MALECKI, I. A.; MAHMOOD, M.; MARTIN, G. B. Appraisal and standardization of curvilinear velocity (VCL) cut-off values for CASA analysis of Japanese quail (*Coturnix japonica*) sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 3, p. 389-396, 2017.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.
- MUINO, R.; RIVERA, M. M.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; PENA, A. I. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n. 1, p. 50-64, 2008.
- PAPA, F. O.; GABALDI, S. H.; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelção de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, n. 1, p. 39-43, 2000.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, n. 3, p. 297-308, 1997.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.