

MOTILIDADE E CINÉTICA ESPERMÁTICA DE TOUROS FRENTE A SAZONALIDADE E A CRIOPRESERVAÇÃO

LUCAS PETITEMBERTE DE SOUZA¹; LUANA CARLA SALVI²; LAÍS DOS SANTOS GONÇALVES³; LUANA FERREIRA VIANA DOS REIS⁴; WILLIAM BORGES DOMINGUES⁵; VINICIUS FARIAS CAMPOS⁶

¹Laboratório de Genômica Estrutural – UFPEL – lucasouza.contato@gmail.com

²Laboratório de Genômica Estrutural – UFPEL – luanacarlasalvi@gmail.com

³Laboratório de Genômica Estrutural – UFPEL – laisdsantosg@gmail.com

⁴Laboratório de Genômica Estrutural – UFPEL – luanafvreis@gmail.com

⁵Laboratório de Genômica Estrutural – UFPEL – williamwwe@yahoo.com.br

⁶Laboratório de Genômica Estrutural – UFPEL – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A avaliação da motilidade e cinética espermática visa mensurar a fertilidade de reprodutores e seus respectivos ejaculados de sêmen (POTIENS, 2022). Em relação aos touros, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) recomenda uma série de análises para o diagnóstico do potencial de fertilidade desses animais, denominado de exame andrológico. No andrológico, além de exames clínicos, a avaliação da qualidade do sêmen é uma das mais importantes formas de se predizer o potencial reprodutivo de um touro, sendo possível avaliar também a libido e a habilidade de monta do animal (MORAES, 2022).

Dentre os parâmetros de análise seminal, podemos dividi-los em dois momentos, sendo o primeiro uma inspeção inicial que, segundo o documento “Recomendações para o diagnóstico da fertilidade potencial em touros” da EMBRAPA, abrange: 1) volume de ejaculado; 2) coloração do sêmen; e 3) concentração subjetiva de células espermáticas (MORAES, 2022). O segundo momento pode ser compreendido como a análise de distintos parâmetros de motilidade, cinética e capacidade espermática. Segundo MATOS e colaboradores (2008) a motilidade é um dos parâmetros mais importantes para avaliar a habilidade do espermatozoide, além de ser um parâmetro amplamente utilizado em pesquisas científicas com o intuito de definir grupos experimentais (DOMINGUES et al., 2020; KELES et al., 2021; TURRI et al., 2021). Além da motilidade, avaliada de forma total e progressiva, existe uma série de outros parâmetros para analisar a cinética espermática, como: Velocidade curvilínea (VCL); Velocidade linear progressiva (VSL); Velocidade média do percurso (VAP); Retilinearidade (STR); Linearidade (LIN); Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH); Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), entre outros (MATOS et al., 2008).

O sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) é uma ferramenta que permite a análise automatizada desses parâmetros espermáticos, os quais são ótimos indicativos da fertilidade seminal. Desse modo, o CASA é um método eficaz, preciso e confiável quando comparado a avaliações convencionais subjetivas (POTIENS, 2022).

Assim, nosso objetivo foi analisar parâmetros de motilidade e cinética espermática em ejaculados de sêmen dos mesmos touros coletadas no verão e inverno e com o sêmen fresco e criopreservado do mesmo ejaculado. Este estudo serve como um piloto para um experimento de prospecção tanto de microRNAs (miRNAs) espermáticos normalizadores de PCR em tempo real quanto de miRNAs biomarcadores de fertilidade em touros.

2. METODOLOGIA

As amostras de sêmen de touros foram cedidas pela empresa Select Sires do Brasil através de um acordo de parceria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação com a UFPEl (<https://www.in.gov.br/web/dou/-/extrato-de-acordo-de-parceria-573231530>).

Foram realizadas coletas de sêmen de 13 animais da raça Angus, com vagina artificial, nos meses de março (verão) e julho (inverno), havendo também nessa última coleta o congelamento de doses do mesmo ejaculado de sêmen. Todas as amostras utilizadas foram provenientes do primeiro ejaculado de cada animal e foram diluídas com *BoviFree* (Minitube, Alemanha).

Em relação às análises de motilidade e cinética espermática, foi utilizado o sistema CASA (*AndroVision®* Minitube, Alemanha). Foram analisados até dez campos microscópicos, totalizando cerca de 2000 células analisadas por amostra. Os parâmetros mensurados foram: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), distância média percorrida (DAP) (μm), distância curvilínea (DCL) (μm), distância retilínea (DSL) (μm), VAP ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), STR (% - VSL/VAP), LIN (% - $\text{VSL/VCL} \times 100$), WOB (%), ALH (μm) e BCF (Hz).

Na análise estatística foi realizado o teste t para amostras não pareadas. Para cada condição (sazonalidade ou tipo de acondicionamento da amostra) foram realizadas análises independentes. O valor de p foi considerado significativo quando $p < 0,05$. A análise estatística e os gráficos foram realizados com o *GraphPad* versão 8.0.1. Os dados foram representados com médias \pm erro padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No que diz respeito a motilidade, pode-se observar que ao comparar as amostras de sêmen dos mesmos touros em estações diferentes, houve uma diminuição significativa da motilidade total e progressiva nas amostras que foram coletadas no verão (Figura 1A). Outro ponto pertinente em relação a motilidade foi observado ao se comparar o sêmen fresco e criopreservado do mesmo ejaculado de cada animal, onde o sêmen criopreservado obteve uma redução significativa da motilidade total e progressiva (Figura 1B).

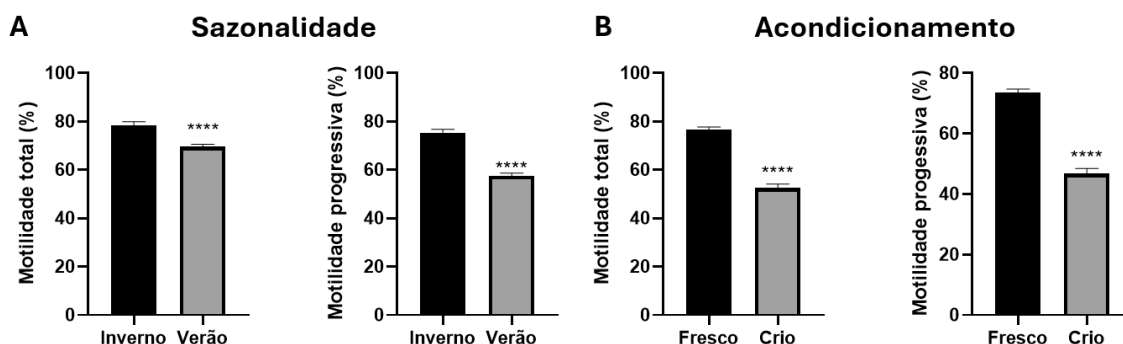


Figura 1: Motilidade espermática total e progressiva de sêmen de touros em diferentes condições de sazonalidade e acondicionamento da amostra. A) Amostras coletadas no verão e inverno; B) Amostras frescas e criopreservadas.

Em relação aos parâmetros de cinética espermática, todos apresentaram diferença significativa em ambas as condições analisadas (sazonalidade e

acondicionamento). Ao analisarmos os valores de DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, ALH, BCF nas amostras criopreservadas quando comparadas às frescas, observou-se uma redução significativa nos dados (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros de cinética espermática DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF no sêmen de touro fresco e criopreservado. Os asteriscos **** representam $p < 0,0001$ e *** representa $p = 0,0001$.

Grupo	DAP	DCL	DSL	VAP	VCL	VSL	STR	LIN	WOB	ALH	BCF
Fresco	44,49 ± 0,48	79,91 ± 1,10	33,65 ± 0,57	101,1 ± 1,00	181,4 ± 2,34	76,35 ± 1,19	0,7490 ± 0,00	0,4176 ± 0,00	0,5548 ± 0,00	4,404 ± 0,05	32,48 ± 0,36
Crio	35,56 ± 0,52	61,01 ± 1,17	28,65 ± 0,48	77,54 ± 1,10	132,8 ± 2,43	62,35 ± 1,01	0,07997 ± 0,00	0,4697 ± 0,00	0,5850 ± 0,00	3,237 ± 0,05	31,01 ± 0,17
	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	***

Quanto aos mesmos parâmetros citados acima, ao analisar as amostras dos mesmos touros no inverno e verão, os achados foram semelhantes, uma vez que DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, ALH, BCF tiveram uma redução significativa em amostras coletadas no verão (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros de cinética espermática DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF no sêmen de touro coletado no inverno e verão. Os asteriscos **** representam $p < 0,0001$ e *** representa $p = 0,0004$.

Grupo	DAP	DCL	DSL	VAP	VCL	VSL	STR	LIN	WOB	ALH	BCF
Inverno	43,14 ± 0,58	77,61 ± 1,35	31,69 ± 0,69	98,03 ± 1,38	176,3 ± 3,17	71,99 ± 1,54	0,7263 ± 0,00	0,4032 ± 0,00	0,5546 ± 0,00	4,366 ± 0,07	30,77 ± 0,28
Verão	24,51 ± 0,52	41,50 ± 1,10	17,70 ± 0,46	54,74 ± 1,15	92,48 ± 2,42	39,57 ± 1,01	0,07128 ± 0,00	0,4249 ± 0,00	0,5957 ± 0,00	2,857 ± 0,05	29,27 ± 0,15
	****	****	****	****	****	****		***	****	****	****

Conforme levantado na revisão de BUTLER e colaboradores (2019), a motilidade é um dos parâmetros amplamente utilizados para aferir a fertilidade de touros. Parâmetros cinéticos também estão relacionados à fertilidade. No nosso estudo, altos valores de VAP, VCL e VSL foram observados, assim como por AGHAZARIAN e colaboradores (2021). Os autores demonstraram uma associação entre estes dados, uma vez que células espermáticas com maior VAP, VCL e VSL estão associadas à maior integridade do DNA, e, consequentemente, maior potencial reprodutivo.

Pesquisas mostram que condições distintas, como o período do ano em que as doses de sêmen são coletadas ou ainda o método de acondicionamento e utilização da amostra (fresca ou criopreservada), são capazes de alterar a qualidade seminal e consequentemente o potencial de fertilidade de touros (KHALIL et al. 2018; MORRELL, 2020). Logo, nossos achados vão ao encontro da literatura, tendo em vista que MORRELL (2020) demonstrou que a fertilidade em touros é mais afetada em condições quentes, levando a uma condição de estresse térmico que interfere na espermatogênese e na funcionalidade do espermatozoide maduro. Bem como o elucidado por KHALIL et al. (2018) que avaliaram espermatozoides de touros durante e após a criopreservação, constatando diminuição significativa na motilidade.

4. CONCLUSÕES

Os parâmetros mensurados de motilidade e cinética espermática mostraram diferença significativa em todas as análises realizadas. Como esperado, a criopreservação interferiu negativamente na motilidade espermática total e progressiva, além de diminuir os valores da grande maioria dos parâmetros cinéticos avaliados, os quais são intimamente ligados à capacidade de fertilização espermática. Por outro lado, em relação ao efeito da sazonalidade sobre a qualidade seminal motilidade cinética espermática se mostraram com melhores taxas naquelas amostras coletadas no inverno.

Baseado em todos os resultados alcançados, foi possível definir grupos experimentais altamente distintos nas amostras de sêmen coletadas. Desta forma, este estudo piloto propiciou o seguimento das demais análises, como a avaliação da morfofuncionalidade e medição dos níveis de miRNAs espermáticos, a fim de desenvolver novas ferramentas moleculares de diagnóstico de fertilidade em touros.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAZARIAN, A; HUF, W; PFLÜGER, H; et al. Standard Semen Parameters vs. Sperm Kinematics to Predict Sperm DNA Damage. **World Journal of Men's Health**, v. 39, n. 1, 116-122, 2019.

BUTLER, M.L; BORMANN, J.M; WEABER, R.L; et al. Selection for bull fertility: a review. **Translational Animal Science**, v.4, n1, 423–441, 2020.

DOMINGUES, W.B; BLODORN, E.B; MARTINS, A.S.W; et al. Transfection of exogenous DNA complexed to cationic dendrimer induces alterations of bovine sperm microRNAome. **Theriogenology**. n.153, 11-19, 2020.

KHALIL, W.A; EL-HARAIRY M.A; ZEIDAN, A.E.B; et al. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**. v.6, S49-S56, 2018.

KELES E; MALAMA, E; BOZUKOVA, S; et al. The micro-RNA content of unsorted cryopreserved bovine sperm and its relation to the fertility of sperm after sex-sorting. **BMC Genomics**. v.22, 1–19, 2021.

MATOS, D.L; ARAÚJO, A.A; ROBERTO, I.G; et al. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.225-232, 2008.

MORAES, J.C.F. **Recomendações para o diagnóstico da fertilidade potencial em touros: baixa qualidade de sêmen de touros de raças sintéticas em condições de clima subtropical**. Embrapa Pecuária Sul. Acessado em 07 out. 2024. Online. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1142793>

MORRELL, J.M. Heat stress and bull fertility. **Theriogenology**. v.156, 62-67, 2020.

POTIENS, J.R. Análises computadorizadas da motilidade espermática (CASA): conceitos e possibilidades de padrões. In: **Anais da VI Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal**, 6., Campinas, 2022.

TURRI, F; CAPRA, E; LAZZARI, B; et al. A combined flow cytometric semen analysis and miRNA profiling as a tool to discriminate between high-and low-fertility bulls. **Frontiers in Veterinary Science**. v.8, 1–12, 2021.