

Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade

A influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade é um tópico bastante discutido na literatura, onde a pesquisa demonstrou que somente a associação entre vários parâmetros de qualidade tem correlação positiva entre ambos e não um único parâmetro. Esta revisão trata dos principais parâmetros de qualidade do sêmen bovino para inseminação artificial e sua relação com a fertilidade, tanto na inseminação artificial convencional como na inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

N. C. SEVERO¹

INTRODUÇÃO
PRINCIPAIS PARÂMETROS UTILIZADOS
PARA AVALIAÇÃO DE SÊMEN
PARÂMETROS FISIOLÓGICOS QUE
INFLUENCIAM A FERTILIDADE
TESTES COMPLEMENTARES
CONCLUSÃO

INTRODUÇÃO

Um programa de inseminação artificial deve incorporar vários itens como a acurada detecção de cios, a correta manipulação e aplicação do sêmen e o momento adequado para a inseminação em relação ao momento da ovulação. A detecção do cio é considerada a mais importante e a mais cara falha dos programas de inseminação artificial. Uma detecção ineficiente de cio resulta em perdas importantes na reprodução. O uso de fármacos para o controle do ciclo estral e da ovulação associado à inseminação artificial em tempo fixo, é

uma ferramenta tecnológica de grande sucesso e em franco crescimento. A correta manipulação do sêmen também é um fator fundamental num programa de inseminação artificial eficiente. Para isso é necessário trabalhar com inseminadores capacitados e qualificados. Os espermatozoides depositados no trato genital da fêmea bovina, através da inseminação artificial, atravessam o útero, a junção útero-tubárica e interagem com o epitélio do oviduto antes de fertilizar o óvulo. Porém é necessário que os espermatozoides apresentem características físicas e morfológicas adequadas para que ocorra a fertilização. Através da avaliação do sêmen, após o processo de congelamento, o profissional capacitado faz inferências sobre a qualidade dos espermatozoides, formando um conceito sobre o poder fecundante da amostra analisada. O tópico tratado aqui será sobre a qualidade do sêmen bovino para inseminação artificial e sua relação com a fertilidade, tanto na inseminação artificial convencional como na inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

foto



¹Neimar Corrêa Severo, Médico Veterinário, Pecplan ABS Imp. e Exp. Ltda, Delta, MG, BRASIL.



PRINCIPAIS PARÂMETROS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DE SÊMEN

As principais avaliações laboratoriais utilizadas para estimar a qualidade potencial de uma dada amostra ou partida de sêmen são relacionadas no **Quadro 1** abaixo, segundo os parâmetros publicados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998):

Quadro 1. Parâmetros mínimos e máximos (CBRA, 1998).

1	Motilidade espermática progressiva – mínimo (%)	30
2	Vigor de motilidade – mínimo (1-5)	3
3	Espermatozóides com motilidade progressiva – mínimo (x 10 ⁶ /dose)	10
4	Motilidade após teste de termo-resistência – mínimo (%)	15
5	Defeitos Maiores Totais - máximo - (%)	20
6	Defeitos Totais – maiores e menores - máximo (%)	30

Outras técnicas foram desenvolvidas para avaliação de sêmen, no intuito de diminuir a subjetividade das análises. Podemos citar os sistemas computadorizados de análise de sêmen (CASA), o uso de sondas fluorescentes para avaliação das estruturas espermáticas por microscopia de epifluorescência ou sistema de citometria de fluxo, avaliação de proteínas do plasma seminal e produção de EROs (espécies reativas ao oxigênio) entre outros (Arruda *et al.*, 2006). Os testes de viabilidade de membrana e o teste de resistência osmótica (Revel & Mrode, 1994) servem para avaliar as lesões de membrana dos espermatozóides, ocasionados pelo processo de congelamento. As lesões das membranas espermáticas provocam a perda de componentes celulares, diminuindo a viabilidade celular e a motilidade pós-congelamento. O teste de avaliação de acrossoma também ajuda na interpretação da qualidade de membranas, apesar das variações quanto aos índices de fertilidade (Pace *et al.*, 1981). Todos estes testes medem o declínio da qualidade celular pós-congelamento. Todavia, ainda não existe um teste que seja preciso e objetivo o suficiente para determinar o potencial de fertilidade de uma partida de sêmen congelado (Bó *et al.*, 2005). Não se deve confundir qualidade de sêmen com fertilidade, porque não são sinônimos, embora exista uma correlação positiva entre ambas (Elliot, 1978). Somente a associação entre vários parâmetros é que pode dar maior segurança na avaliação de fertilidade de uma dada amostra de sêmen (Den Daas, 1997). A maioria das centrais utiliza a associação de quatro parâmetros básicos para avaliação do sêmen pós-congelamento: o percentual de motilidade espermática progressiva, o número de espermatozóides com motilidade progressiva por dose, a morfologia espermática e a incubação da amostra.

PARÂMETROS FISIOLÓGICOS QUE INFLUENCIAM A FERTILIDADE

Motilidade Pós-Congelamento

O método de avaliação direta do percentual de motilidade é utilizado pela maioria das centrais, como parâmetro básico para interpretar a qualidade da amostra de sêmen. A avaliação direta da motilidade ao microscópio é uma técnica subjetiva e

dependente da capacitação do avaliador, além da baixa repetibilidade dos resultados entre diferentes avaliadores, o que leva a interpretações equivocadas (Pace *et al.*, 1981). Siqueira *et al.* (2007) mostraram correlação negativa e de média intensidade entre motilidade progressiva retilínea pós-descongelamento e a taxa de fertilidade (-0,22). Para fazer a avaliação da motilidade é utilizado um microscópio com contraste de fase, com platina aquecida a 37° C e a amostra é examinada em 200 aumentos, entre lâmina e lamínula. Recentemente, muitas centrais implantaram o método de avaliação computadorizada de análise de sêmen (CASA) em substituição a avaliação direta da motilidade. A motilidade pós-congelamento não é um fator decisivo na escolha do sêmen para a inseminação artificial. Pace (2005) mostrou que, mesmo com variações na qualidade do sêmen congelado comparado em duas épocas (1972 x 1988), utilizando a mesma técnica de avaliação, não houve diferença nos índices de prenhez ao longo do tempo (**Quadro 2**).

Para a IATF, Bó *et al.* (2005) recomendam o uso de doses que tenham acima de 30% de motilidade ao descongelamento. Contudo, consideram que não há dados na literatura que determinem os padrões mínimos de sêmen para uso na IATF.

Quadro 2. Resumo da média de percentagem de motilidade progressiva (fotomotilidade) versus média da percentagem de não retorno aos 60-90 dias (touro holandeses) – Pace, 2005 – Dados não publicados

Ano	1988	1988	1972	1972
Parâmetros	< 40%	40% >	< 40%	40% >
Média de Motilidade pós-congelamento (%)	32,7	45,7	31,8	46,2
Número de Serviços	285.639	288.048	68.904	131.122
Número de Não Retornos	215.892	215.756	51.443	101.548
% de Não Retorno	75,5	74,9	76,9	77,4

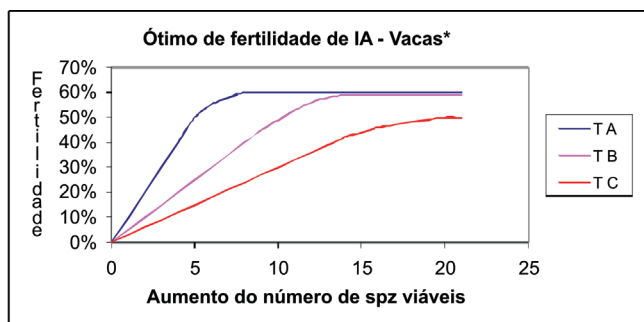
Número de Espermatozóides Móveis por Dose

Os primeiros trabalhos que estabeleceram os padrões de sêmen congelado geralmente aceitavam acima de 10 milhões de espermatozóides com motilidade progressiva por dose como mínimo para uma boa fertilidade (Sullivan & Elliot, 1968). À medida que aumentaram o número de informações de campo, se estabeleceram novos padrões para sêmen congelado e hoje a indústria de inseminação artificial trabalha com 6 a 10 milhões de móveis por dose (Pace *et al.*, 1981). Touros de alta fertilidade podem trabalhar com parâmetros de 1 a 11 milhões de móveis por dose, mantendo altas taxas de não retorno aos 56 dias após inseminação (Den Daas *et al.*, 1997). Touros de fertilidade média a baixa necessitam de uma concentração maior de espermatozóides móveis, porém nunca ultrapassando 15 milhões de móveis por dose, conforme o **Gráfico 1**. Um dos principais conceitos sobre fertilidade diz que ela é a relação entre qualidade e quantidade de espermatozóides inseminados (Elliot, 1978). Baseado neste conceito, Pace *et al.* (1981) consideram que, para uma dada característica do sêmen (número de móveis por dose, por exemplo) a fertilidade aumenta em função do aumento da mesma até um valor máximo, a partir do qual outros fatores tornam-se limitantes da fertilidade, fatores do sêmen (fatores intrínsecos) ou das fêmeas inseminadas (fatores extrínsecos). Como regra geral, os touros de menor



fertilidade requerem mais espermatozoides por dose para alcançar seu valor máximo de taxa de não retorno, até um nível onde mesmo aumentando a concentração de espermatozoides, as taxas de não retorno permanecem as mesmas. Esses fatores, que influenciam no gráfico de fertilidade, foram chamados de fatores compensáveis e fatores não compensáveis de fertilidade por Saacke *et al.* (1994). Porém, é o número de espermatozoides inseminados com uma dada característica e não a porcentagem que está ligada com fertilidade, por exemplo, o número de espermatozoides móveis e com membranas intactas e que alcançam o oviduto para fertilizar o óvulo. O **Gráfico 1** mostra o touro A como padrão, o touro B apresenta uma deficiência na fertilidade que pode ser compensada aumentando a concentração de espermatozoides na palheta e o touro C apresenta fatores não compensáveis de fertilidade mesmo aumentando o número de espermatozoides por inseminação (Sullivan & Elliot, 1968).

Gráfico 1. Curva de fertilidade (Sullivan, J.J. & Elliot, F.I. 1968. Bull fertility as affected by an interaction between motile spermatozoa concentration and fertility level in artificial insemination. In: 6th Cong. Inter. Reprod. Anim. I.A. Vol II p 1307-1309. Paris).



* Correlação entre fertilidade e o número de espermatozoides inseminados. O sêmen de diferentes touros difere em sua fertilidade e na velocidade em que alcança o ponto máximo de fertilidade.

TA - touro de fertilidade alta, TB - touro de fertilidade média, TC - touro de fertilidade baixa

Morfologia Espermática

A morfologia espermática pode ser descrita como o estudo anatômico da célula espermática. As centrais usam a morfologia espermática como parte do controle de qualidade para decidir o destino do ejaculado. A porcentagem de espermatozoides normais tem boa correlação com a fertilidade a campo de 0,59 (Correa *et al.*, 1997). Na rotina de avaliação da morfologia espermática é utilizado um microscópio com contraste de fase ou com contraste de interferência diferencial, em 1000 aumentos com a amostra entre lâmina e lamínula coberta com óleo de imersão. São contadas de 100 a 200 células por amostra, com boa repetibilidade entre repetições. Os principais sistemas de classificação de defeitos espermáticos são baseados: 1º na origem das anormalidades, se testicular ou extra-testicular, em defeitos primários e secundários (Blom, 1950 citado por Barth & Oko, 1989) e, 2º no efeito das anormalidades sobre a fertilidade em defeitos maiores e menores (Blom, 1973 citado por Barth & Oko, 1989). Pesquisas de Saacke (1990) demonstraram que algumas anormalidades têm efeito

maior na fertilidade do que outras e sugeriram uma classificação em defeitos compensáveis e não compensáveis. Todo o ejaculado tem algum tipo de alteração. As três principais perguntas que se deve fazer quanto à morfologia são (Saacke, 1990):

1. Quais tipos de alterações são realmente anormalidades?
2. Quais tipos de anormalidades causam infertilidade?
3. Quais são os níveis toleráveis dessas anormalidades?

Várias anormalidades foram estudadas e consideradas compensáveis, por exemplo, células abaxiais, caudas dobradas, aplasia segmentar da peça intermediária e alguns defeitos de cabeça (Barth & Oko, 1989). Nesses casos o aumento da concentração de espermatozoides compensaria essa deficiência porque estas células são retidas ao longo do trato genital, não alcançando o oviduto para fertilização (Saacke, 2000). Outras anormalidades são não compensáveis, mesmo aumentando a concentração de espermatozoides por palheta, como é o caso dos defeitos de núcleo (diadema, vacúolos) e de cabeça (piriformes e acrossomas com grânulo). Os trabalhos de Saacke sobre espermatozoides acessórios demonstraram que um dos defeitos não compensáveis é a cratera/diadema com forma normal de cabeça, porque estes espermatozoides fertilizam o óvulo, mas ocorre elevada perda embrionária logo após.

TESTES COMPLEMENTARES

Teste de termo-resistência ou incubação: este teste foi utilizado por Jondet & Rabadeux (1977) para avaliar a resistência dos espermatozoides à incubação em água morna a 38°C, por um tempo de 5 horas de exposição. Aquelas amostras incubadas no banho e que apresentavam motilidade de 20% ou mais eram consideradas aptas para o uso na inseminação artificial. A correlação com fertilidade era alta, mas essas amostras também apresentavam outras características de qualidade que influenciavam no resultado a campo (excelente motilidade inicial e elevado número de espermatozoides normais). Foram criados vários tipos de teste de incubação, sendo os mais conhecidos o Teste de Termo-resistência Rápido (30 minutos à 46°C), o Teste de Termo-resistência Lento (5 horas à 38°C) e um teste de incubação intermediário (3 horas à 36°C) que é o mais utilizado. O fundamento do teste de incubação é avaliar a resistência das células ao meio diluidor, à temperatura da água e ao tempo de exposição. Porém, muitas variáveis influenciam o resultado do teste, como o tipo de diluidor, o tipo de palheta (volume), a concentração por dose, o tempo de exposição (3 ou 5 horas), a temperatura (38°C x 46°C), incubação da amostra na palheta ou fora dela, etc. Graças às muitas variáveis, a incubação deixa de ser um teste objetivo, aumentando a subjetividade da interpretação do resultado final. A validade do teste de incubação é para avaliar a capacidade de resistência dos espermatozoides ao meio diluidor, medindo se o processo de produção está bem feito. Para usar como único parâmetro de qualidade de uma amostra de sêmen, o teste não tem valor.

CONCLUSÃO

Apesar de todo o esforço da pesquisa em busca de métodos de avaliação que predigam a fertilidade do sêmen, ne-



nhum teste laboratorial isolado pode estimar com exatidão o seu potencial de fertilidade. Os espermatozoides necessitam apresentar vários atributos capazes de capacitá-los para a fertilização do ovócito. A associação de características como o percentual de motilidade, número de espermatozoides com movimento progressivo e o percentual de espermatozoides com morfologia normal permite fazer uma estimativa melhor da capacidade fecundante de uma dada amostra. Vale lembrar sempre da importância da qualidade do sêmen para se obter bons percentuais de prenhez, tanto nos programas de inseminação artificial convencional como nos programas de IATF. A qualidade do sêmen a ser utilizado na IATF é um dos fatores mais importantes no rol de itens de um programa. O uso de sêmen de má qualidade poderá prejudicar os resultados de um programa pondo a perder todos os esforços empreendidos na preparação do rebanho e no investimento em tecnologia (veterinário, fármacos, etc.). Quando o sêmen é armazenado nas fazendas ou pontos de venda, é recomendável realizar uma avaliação da qualidade de todas as partidas a serem utilizadas prévias a IATF. Esta recomendação é menos importante quando o sêmen for recentemente adquirido de uma central.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ARRUDA, RP; CELEGHINE, ECC; ANDRADE, AFC; RAPHAEL, CF & PERES, KR & NEVES, LC. Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF. *Biotechnology da Reprodução em Bovinos*, 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, PR, p.157-164, 2006.
- BARTH, AD & OKO, RJ. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa, first edition, 1989, 285 p.
- BÓ, G, CUTAIA, L, CHESTA, P, BALLA, E, PICINATO, D, PERES, L, MARAÑA, D, AVILÉS, M, MENCHACA, A, VENERANDA, G, BARUSELLI, P. Implementación de Programas de Inseminación Artificial em Rodeos de Cría de Argentina. *Proceedings VI Simposio Internacional de Reproducción Animal*, 2005, IRAC, Argentina, p.97-128, 2005.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, CBRA, 2ª edição, 1998, 49 p.
- Den DAAS, JHG, JONG, G, LANSBERGEN, LMTE & De LEEUW, AM. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. *J Dairy Sci*, 81:1714-1723, 1998.
- CORREA, JR, PACE, MM & ZAVOS, PM. Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination programa. *Theriogenology*, 48:721-731, 1997.
- ELLIOT, F.I. Significado de la calidad del semen. In: Salisbury, G.W.; VanDemark, N.L. & Lodge, J.R. **Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos**, Editorial Acribia, p.449-462, 1978.
- JONDET, R & RABADEAUX, Y. Utilização do teste de termo-resistência na avaliação do valor do esperma bovino congelado. *Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*, tradução nº 04/77, 1977, 8 p.

- PACE, M.M., SULLIVAN, JJ, ELLIOT FI, GRAHAN EF & COULTER GH. Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoa quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0.5-ml French straws. *J Anim Sci*, 53:693-701, 1981.
- REVELL, SG & MRODE, M. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci*, 36:77-86, 1994.
- SAACKE, RG. What is abnormal? And is abnormal dependent upon the animal? *Proc. of the 13th Tech. Conf. on Art. Ins. & Reprod.*, NAAB, p.67-73, 1990.
- SAACKE, RG. Fertility in the bovine male: current status and future prospects (An opinion). *Proc. of the 18th Tech. Conf. on Art. Ins. & Reprod.*, NAAB, p.90-96, 2000.
- SULLIVAN, JJ. & ELLIOT, FI. Bull fertility as affected by an interaction between motile spermatozoa concentration and fertility level in artificial insemination. *Proceedings 6th Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem. Paris, France. Vol II:1307-1309*, 1968.
- SIQUEIRA, JB, GUIMARÃES, JB, COSTA, EP, HENRY, M, TORRES, AA, SILVA, MVGB & SILVEIRA TS. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. *R. Bras. Zootec.*, 36:387-395, 2007.

Résumé

L' influence de la qualité du sperme bovin congelé sur la fertilité

N. C. Severo

L'influence de la qualité du sperme bovin congelé sur la fertilité est un point beaucoup discuté dans la littérature. La recherche a montré que seulement l'association entre plusieurs paramètres de qualité a une corrélation positive et jamais un paramètre unique. Cette révision nous montre les principaux paramètres de qualité du sperme bovin pour l'insémination artificielle e leur relation avec la fertilité, aussi bien pour l'insémination artificielle conventionnelle, comme pour l'insémination artificielle en temps fixe (IATF).

Summary

Influence of the Quality of Frozen Bovine Semen on Fertility

N. C. Severo

The influence of quality of frozen bovine semen on fertility is a very discussed topic in the literature search which showed that only the association between various parameters of quality has a positive correlation between them. The topic here will be treated on the quality of bovine semen for artificial insemination and their relationship to fertility, both in conventional artificial insemination and in timed artificial insemination (TAI).