

Análises computadorizadas da motilidade espermática (CASA): conceitos e possibilidades de padrões

Computerized analysis of sperm motility (CASA): concepts and possibilities of standards

José Roberto Potiens^{1*}

¹Seleon Biotecnologia Animal, Itatinga, SP, Brasil.

Resumo

O melhoramento genético possibilitou a evolução da eficiência e taxas de desfrute da pecuária nacional. A biotécnica da IATF (Inseminação Artificial por Tempo Fixo) consolidou-se como a principal ferramenta de disseminação de genética melhorada em rebanhos de leite e de corte. A avaliação espermática laboratorial tem o objetivo de analisar o potencial de reprodutores/partidas de sêmen e buscar a desafiadora tarefa de determinar e estabelecer características confiáveis que possam ser utilizadas como indicadores de fertilidade. Nesse contexto emerge o sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) como ferramenta promissora para obtenção de parâmetros indicativos de fertilidade seminal.

Palavras-chave: CASA, motilidade, fertilidade

Abstract

Genetic improvement enabled the evolution and efficiencies of national livestock activity. The IATF (Fixed Time Artificial Insemination) biotechnology, has established itself as the main tool for the dissemination of improved genetics in dairy and beef herds. Laboratory sperm evaluation aims to analyze the potential of a sires/semen batches and seek the challenging task of determining and establishing reliable characteristics that can be used as fertility indicators. In this context, the computerized system of sperm motility (CASA) emerges as a promising tool for obtaining parameters indicative of seminal fertility.

Keywords: CASA, motility, fertility

Introdução

O melhoramento genético obtido pela pecuária nacional nas últimas décadas possibilitou a evolução da eficiência e taxas de desfrute da atividade, resultando no incremento de sustentabilidade ambiental, gerando ganhos econômicos, aumento na segurança alimentar do Brasil e colocando o país em posição de destaque como exportador de carne ao mundo e também de genética para países de realidade climática semelhante.

A biotécnica da IATF (Inseminação Artificial por Tempo Fixo), uma conquista da pecuária nacional, consolidou-se a partir dos últimos 15 anos como a principal ferramenta de disseminação de genética melhorada em rebanhos de leite e de corte, sendo responsável por mais de 90% das doses de sêmen utilizadas nesse segmento.

Por serem um dos componentes desta cadeia, os CCPS (Centros de Colheita e Processamento de Sêmen) são desafiados a atender essa crescente demanda, bem como a promover melhoria constante em seus processos, de modo a aumentar sua produção de doses e ampliar a garantia de qualidade do seu produto.

A avaliação espermática laboratorial tem o objetivo de analisar o potencial de reprodutores/partidas de sêmen e buscar a desafiadora tarefa de determinar e estabelecer características confiáveis que possam ser utilizadas como indicadores de fertilidade. Na rotina laboratorial dos CCPS praticam-se em geral avaliações subjetivas de motilidade, determinação dos percentuais de espermatozoides morfolologicamente normais e concentração de células espermáticas por dose. Entretanto, em um mercado onde se exige cada vez mais informações de predição de fertilidade seminal na IATF tais avaliações podem ser insuficientes.

Nesse contexto, emerge o sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) como ferramenta promissora para obtenção de parâmetros indicativos de fertilidade seminal. Autores como Kathiravan et al. (2011) e outros o descrevem como um método mais eficaz, preciso e confiável para avaliação de

*Correspondência: jose.roberto@seleon.com.br

Recebido: 12 de maio de 2022

Aceito: 17 de maio de 2022

fertilidade do que a forma subjetiva convencional. Também afirmam que os resultados obtidos são mais seguros, repetíveis, com maior capacidade preditiva, o que pode ser padronizado. Entretanto, a maioria dos trabalhos científicos disponíveis na área foram realizados fora do país, em realidades diferentes da nossa.

Importante enfatizar que a IATF, como praticada no Brasil, implica em realidade distinta e que requer nossos próprios estudos e abordagens, desafiando os diferentes segmentos da Andrologia nacional à busca de soluções para estes desafios.

Sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*)

O sistema CASA foi desenvolvido no início da década de 1980, com o objetivo de proporcionar uma visão mais objetiva da análise da motilidade do espermatozoide pela reconstrução da trajetória e sua classificação em diferentes categorias, para fornecer mais detalhes da motilidade e estimativa de fertilidade (Mortimer, 1997). Rapidez e precisão nos resultados tornam o sistema adequado para rotina em Universidades, Centros de Pesquisa, laboratórios dos CCPS e também de prestadores de serviços em análises seminais.

Por sua agilidade de execução e praticidade devem ser estimulados estudos visando a correlação dos resultados de motilidade e cinética obtidos pelo CASA com outros mais elaborados, demorados e custosos como os obtidos pela Citometria de Fluxo.

- Exemplificando, pudemos observar por meio de análises realizadas em nosso laboratório (Correlação de Pearson e Estudo observacional com 15.000 IATF) altas correlações entre percentual de células móveis e progressivas obtidos pelo CASA, com Integridade de Membrana ($r=0,735$ e $0,694$) e Potencial de Mitocôndrias ($r=0,620$ e $0,584$).

Em função de resultados promissores dentro de nossa realidade, o sistema CASA deve ser utilizado buscando todas suas potencialidades e não somente para dirimir a subjetividade das análises em microscopia óptica. Assim, devemos resistir ao impulso de, para aprovação ou reprovação de partidas de sêmen/touros para IATF, preestabelecer limites de corte (*cutoffs*) com rigor excessivo para alguns parâmetros obtidos pelo CASA, sem o devido embasamento de estudos aprofundados ligando tais parâmetros a taxas de concepção obtidas.

A associação de múltiplas variáveis de movimento, geradas pela técnica CASA, mostra maior correlação com fertilidade in vivo em relação à utilização de apenas uma característica de movimento (Farrel et al., 1996).

Obstáculos à emissão e padronização de laudos do CASA

Seguem abaixo alguns fatores a considerar visando os desafios a serem superados na questão da utilização de laudos de análises do sistema CASA como padrão para orientação aos diversos segmentos da cadeia da IATF:

- Como fontes de variação já bem discutidas podem ser citadas: Modelo/Marca dos equipamentos (IVOS, SCA, Androvision, etc.), *setups* praticados, câmaras/lâminas (Leja, Minitube, Mackler, lâmina/laminula, etc.), tempo de incubação da amostra, técnica de preenchimento da câmara, entre outros (Simonik et al., 2015).
- Um ponto importante é quanto ao tipo de diluidor utilizado, considerando-se dois grupos principais, o primeiro aquele à base de gema de ovo e o segundo os sintéticos, livres de produtos biológicos.

Fizemos ensaios em nossa rotina laboratorial com divisão de ejaculados e diluição das frações com os dois tipos de diluidores mencionados (Tabelas 1 e 2).

- Observamos, ao analisar as amostras pós-descongelamento, diferenças obtidas não somente em motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) que tendem a serem maiores com o uso dos diluidores sintéticos, mas também na cinética espermática que exibiu valores aumentados de velocidade curvilínea (VCL) e deslocamento lateral de cabeça (ALH), acompanhados da diminuição de linearidade (LIN).

Tabela 1. Testes comparativos entre diluentes (Tris gema x sintético).

DILUIDOR	TOURO/PARTIDA	ANÁLISE SUBJETIVA			CASA (IVOS II)			
		MOT (%)	VIGOR (1-5)	MT (%)	MP (%)	VCL (µm/s)	LIN (%)	ALH (µm)
Tris-gema	Touro A part.180219-1	50	3-4	66,60	49,80	172,00	59,92	7,79
Sintético	Touro A part.180219-2	50	3-4	68,20	47,80	210,00	46,47	9,87
Tris-gema	Touro B part.210219-1	60	3	62,40	43,40	160,64	57,57	7,32
Sintético	Touro B part.210219-2	70	3	83,60	63,70	226,27	47,67	9,86
Tris-gema	Touro C part.210219-1	50	3-4	40,60	25,10	141,65	58,23	6,59
Sintético	Touro C part.210219-2	60	3-4	44,80	33,30	199,97	54,62	8,91
Tris-gema	Touro D part.210219-1	45	3-4	43,70	31,70	166,16	58,65	7,47
Sintético	Touro D part.210219-2	50	3-4	68,90	46,30	211,98	46,37	9,46
Tris-gema	Touro E part.210219-1	60	3-4	60,90	42,00	141,85	57,80	6,20
Sintético	Touro E part.210219-2	60	3-4	70,70	54,50	193,93	53,19	8,63

MT (motilidade total, %); MP (motilidade progressiva, %); VCL (velocidade curvilinear, µm/s); LIN (linearidade, %), ALH (deslocamento lateral de cabeça, µm).

Fonte: Seleon Biotecnologia Animal Ltda

Tabela 2. Média de valores dos parâmetros dos diluidores independente dos touros

Diluidor	Análise Subjetiva			CASA (IVOS II)			
	Mot (%)	Vigor (1-5)	MT (%)	MP (%)	VCL (µm/s)	LIN (%)	ALH (µm)
Tris-gema	53,0±6,7	3,4±0,2	54,8±11,8	38,4±9,9	156,5±14,0	58,4±0,9	7,1±0,7
Sintético	58,0±8,4	3,4±0,2	67,2±14,0	49,1±11,2	208,4±12,4	49,7±3,9	9,3±0,6

- Outra questão digna de nota é que ao se elaborarem os laudos não há padronização na consideração das distintas populações de espermatozoides disponíveis no *layout* do equipamento. Os universos considerados podem ser, por vezes, tanto as células totais, como as células móveis ou as progressivas, implicando em laudos portando valores sem bases comparativas entre si, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados de análise no CASA de um único touro, considerando populações distintas de espermatozoides (totais, móveis e progressivas), disponíveis no *layout* do equipamento

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS	POPULAÇÕES DE CÉLULAS AVALIADAS NO SISTEMA CASA		
	TOTAIS	MÓVEIS	PROGRESSIVAS
MT (%)	66,1		
MP (%)	40,9		
VAP (µm/s)	77,9	117,9	140,4
VSL (µm/s)	60,8	92,3	123,5
VCL (µm/s)	150,9	228,4	249,7
STR (%)	48,9	74,1	88,0
LIN (%)	26,1	39,5	49,6
ALH (µm)	7,4	11,5	11,3
BCF (Hz)	19,9	28,9	24,6

MT (motilidade total, %); MP (motilidade progressiva, %); VAP (velocidade do trajeto, µm/s); VSL (velocidade progressiva, µm/s); VCL (velocidade curvilinear, µm/s); ALH (amplitude do deslocamento lateral de cabeça, µm); BCF (frequência de batimento, Hz); STR (retilinearidade, %); LIN (linearidade, %).

Fonte: Seleon Biotecnologia Animal Ltda

Panorama atual da determinação de fertilidade seminal a campo na IATF

Várias empresas que comercializam sêmen praticam análise detalhada de informações de campo vindas dos programas de IATF visando identificar os touros com melhores taxas de concepção. O objetivo é encontrar respostas à variação de concepção de touros no campo que não são explicadas pelas análises laboratoriais convencionais. Durante muitos anos, a avaliação da qualidade espermática levava em conta apenas o exame convencional constituído pela análise de motilidade, vigor, concentração e morfologia (Barth & Oko, 1989; Aitken, 2006; Kizilay & Altay, 2017).

Vale salientar que pelo cenário atual, no contexto dessas análises *in vitro*, aquelas elaboradas pelo sistema CASA ainda não são preponderantes como predição de fertilidade, algo que poderia agregar valor para estimar o potencial de touros que chegam às Centrais sem histórico de campo conhecidos.

Acreditamos que mudanças nessa questão estão em um curso positivo para que a análise computadorizada de sêmen ganhe sua devida importância como fator de predição, à medida que novos estudos sejam elaborados.

Baseado nos resultados de campo obtidos, em linhas gerais os touros são classificados em categorias de fertilidade desde os “inferiores” até os “elite”, como apresentado na Figura 1. Considerando a medição de fertilidade pela taxa de concepção obtida em IATF, julgamos a importância de aferir se touros líderes, ao serem apresentados como tais, são testados em situações que representem reais desafios para sua fertilidade seminal, como diferentes escores de condição corporal das vacas inseminadas.

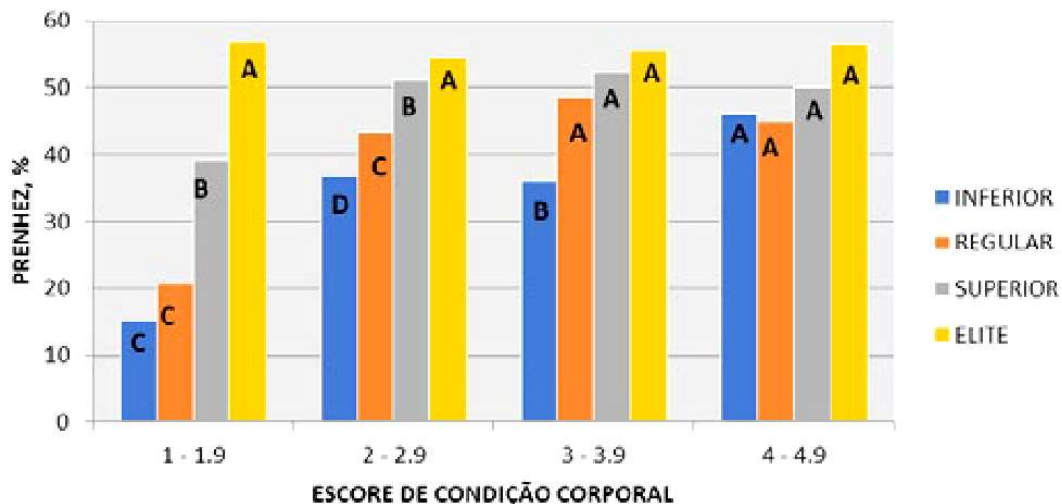


Figura 1. Taxa de prenhez de vacas com diferentes escores de condição corporal, inseminadas em tempo fixo, com sêmen de touros de quatro classes de fertilidade (Nogueira et al., 2018).

Tais situações seriam aquelas relacionadas a variáveis ligadas a fisiologia ovariana dos lotes de fêmeas sincronizadas, considerando-se o nível de dispersão dos tempos de ovulação obtidos, bem como o tamanho dos folículos pré-ovulatórios encontrados (Pfeiffer et al., 2019; Alves et al., 2021), como demonstrado na Figura 2.

Dessa forma, a administração de GnRH no momento da IA aumenta a taxa de concepção, especialmente em vacas sem expressão de estro, como primíparas e aquelas com menor condição corporal.

Seguindo esta linha de raciocínio é pertinente que a longevidade do potencial fertilizante das células espermáticas durante seu trânsito pelo trato genital da fêmea possa ser de alguma forma estimada, especialmente pela ocorrência de situações onde a concentração de ovulações não é satisfatória.

Para tanto, seria o sistema CASA uma ferramenta adequada para estimar essa longevidade?

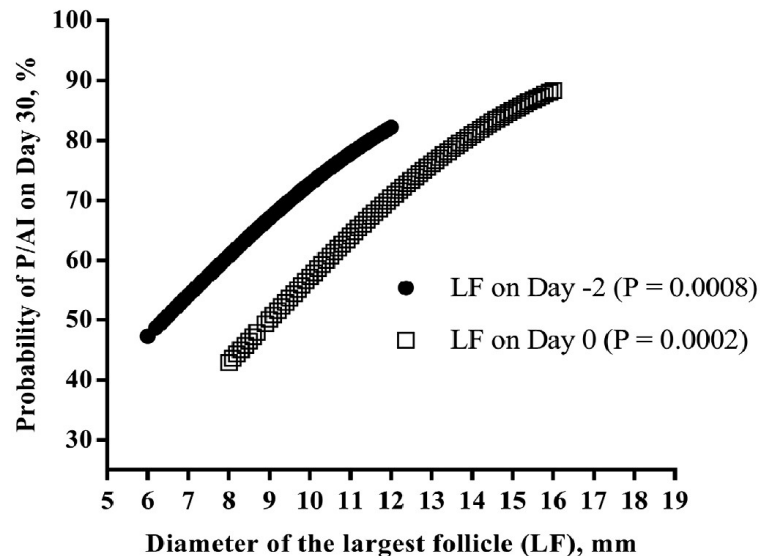


Figura 2. Probabilidade de ovulação e de taxa de concepção após a IA cronometrados baseados em estradiol/progesterona após combinações hormonais visando melhorar os resultados reprodutivos de vacas *Bos indicus* (Alves et al., 2021).

Hiperativação espermática estimada pelo CASA

Uma estimativa mais precisa do potencial de fertilidade na IATF envolve o desenvolvimento e a maturação mais precisamente controlados de gametas masculinos e femininos e pode ser alcançada quando as características do sêmen e a resposta ovariana são consideradas.

Os espermatozoides requerem um período de maturação, definido como capacitação, após a ejaculação e separação do plasma seminal no trato reprodutivo feminino antes que atinjam a capacidade de sofrer uma reação acrossômica e contribuir para a fertilização de um ovócito (Austin, 1951; Chang, 1951; Bedford, 1983).

Espermatozoides em processo de capacitação apresentam motilidade hiperativada caracterizada por batimento flagelar assimétrico - que resulta no aumento da amplitude da curva flagelar principal - antes de atingir o local de fertilização na tuba uterina (Demott *α* Suarez, 1992; Suarez, 1987; Katz *α* Yanagimachi, 1980).

A absorção e elevação de concentração de cálcio intracelular durante o processo de refrigeração contribui para o início da capacitação, modificações na hiperativação e desenvolvimento de eventos de fusão entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa, tendo como consequência, redução na capacidade de fertilização do sêmen (Watson, 2000).

A alta viscosidade do muco cervical e a necessidade dos espermatozoides serem progressivamente móveis para uma penetração bem-sucedida no muco sugerem que a motilidade hiperativada não ocorreria nessa região. Neste caso os espermatozoides não atravessariam o muco cervical com sucesso e, portanto, seriam perdidos no trato feminino (Mortimer, 1997).

Foi demonstrado em hamsters que um padrão linear de motilidade é necessário para a passagem pela junção útero-tubárica (Shalgi et al., 1992). Espermatozoides de coelho hiperativados recuperados da ampola mostraram mudanças frequentes em sua direção de movimento. Foi proposto que isso poderia impedir a perda de espermatozoides do local de fertilização, bem como fornecer uma oportunidade para um "padrão de busca" para o cumulus. Além disso, ao mudar de direção com frequência, os espermatozoides seriam menos propensos a ficarem presos nas dobras e criptas do epitélio ampular em comparação com os espermatozoides não hiperativados que nadam em linha reta que entrariam em espiral nas criptas e depois seriam incapazes de escapar (Suarez et al., 1983).

Os espermatozoides hiperativados, através de sua movimentação vigorosa espalham mais fluido tubárico estimulando trocas metabólicas favoráveis para penetração na zona pelúcida (ZP) (Katz, 1989). Quanto maior o número de espermatozoides acessórios presos à ZP maior a qualidade embrionária (Saacke, 2008).

A análise de sêmen auxiliada por computador (CASA) tem sido usada para caracterizar a

motilidade espermática e avaliar certas variáveis cinemáticas, como VCL, ALH e LIN. Tais variáveis estão associadas às características de hiperativação do sêmen congelado-descongelado (Mortimer e Mortimer, 1990; Shojaei et al., 2012).

Não há um consenso que defina os critérios da motilidade hiperativada, porém, os parâmetros que distinguem o espermatozoide hiperativado são: alto VCL e baixa linearidade ainda que existam variações dos valores obtidos nos trabalhos (Verstegen et al., 2002).

Quanto ao ALH, é importante que seja baixo, já que seu aumento pode estar relacionado com a hiperativação celular (Shojaei et al., 2012). Muiño et al. (2008) realizaram estudos para as características de motilidade espermática e para avaliar a hiperativação da motilidade utilizaram os seguintes parâmetros descritos por Mortimer (1997): $VCL \geq 180$, $LIN \leq 45$ e $ALH \text{ máximo} > 10$.

O estudo da cinética no sêmen pós-criopreservado de touro pode fornecer mais informações sobre a viabilidade do espermatozoide no trato reprodutivo feminino (Pfeiffer et al., 2019).

Criocapacitação x Hiperativação espermática

A criopreservação causa danos à membrana plasmática e causa alterações semelhantes à capacitação espermática em parte dos espermatozoides, o que pode advir do ingresso de cálcio neste processo (Collin, 2000).

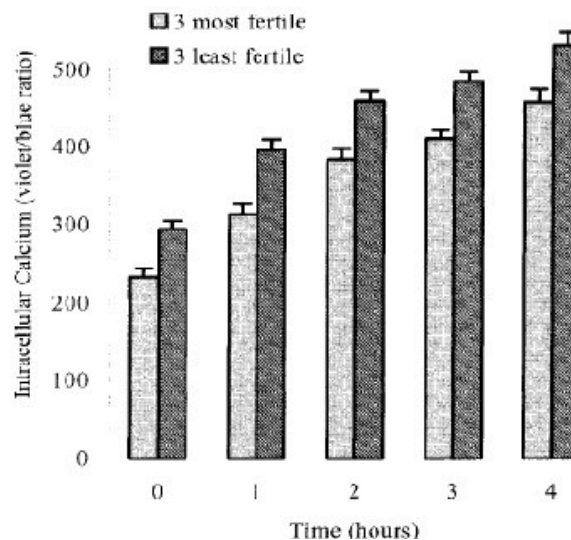


Figura 3. Comparação de touros com alta e baixa fertilidade, com base no nível de Cálcio nas células espermáticas em diferentes momentos pós adição de Talp BSA mais Heparina. (Collin et al, 2000).

O mecanismo de criopreservação pode promover desestabilização da membrana plasmática e elevação do cálcio intracelular, semelhante ao que ocorre durante a capacitação espermática (Cormier et al., 1997).

Membranas espermáticas com baixa relação colesterol/fosfolípídeo são mais fusogênicas, portanto os gametas levam menos tempo para se capacitar e estão mais propensos em sofrerem reação acrossomal (Yanagimachi, 1994; Hoshi, 1990).

Análises pelo CASA x fertilidade: estudos no cenário nacional

1- Relação da viabilidade do sêmen criopreservado sobre a taxa de prenhez na inseminação artificial em tempo fixo de vacas Nelore (Pereira et al., 2021). Como abaixo descrito:

Embora tenha havido diferença ($P = 0.004$) na VSL para sêmen de touros Angus, não houve aumento da taxa de concepção em relação a vacas inseminadas com touros Nelore (51.0% versus 50.0%, $P > 0.05$). O presente estudo proporcionou a formação de grupos para interpretar os resultados em relação às taxas de concepção (Tabela 4).

Nestes grupos formados, os espermatozoides considerados de boa qualidade por apresentarem VSL mais altas, bem como maior Atividade Mitocondrial (MITO) não foram aqueles que resultaram em melhores taxas de concepção (Grupo 4).

Já o Grupo 4 apresentou as melhores taxas de concepção, contendo resultados mais equilibrados entre os parâmetros da VSL e MITO (VSL 71,16 $\mu\text{m/s}$, MITO 49,69%, T x P 62,4%).

Tabela 4. Representação do melhor resultado de cluster em Análise de Cluster.

Cluster	n (%)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	MITO (%)	TxP (%)
Cluster 1	24,1	76,4	46,2	34,3
Cluster 2	13,8	82,3	32,0	50,2
Cluster 3	31,0	71,1	49,7	62,4
Cluster 4	31,0	91,2	53,4	53,6

Legenda: n = porcentagem de partidas de sêmen; VSL = velocidade progressiva MYTH = porcentagem de mitocôndria polarizada; TxP = FTAI taxa de gestação (Pereira et al., 2021).

Uma hipótese para esse achado diz respeito à mitocôndria ser a principal fonte de fatores pró-oxidativos, sugerindo que ela tem um papel central no desequilíbrio oxidativo.

Portanto, concluíram que diferentemente da IA (Inseminação Artificial) após observação do estro, na IATF há maior dispersão no momento da ovulação entre as fêmeas sincronizadas. A capacitação espermática precoce, associada ao estresse oxidativo e maior velocidade progressiva, poderia reduzir a sobrevivência dos espermatozoides no trato genital feminino, consequentemente restringindo sua capacidade de fertilização.

2- Função espermática e status oxidativo: Efeito na fertilidade de touros *Bos taurus* e *Bos indicus* com semen utilizado para IATF (Leite et al., 2022).

O estudo da cinética do sêmen de touros pode, por exemplo, fornecer informações adicionais sobre a viabilidade dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea, havendo estudos recentes sobre a associação de parâmetros da cinética espermática com hiperativação precoce de espermatozoides e padrões de fertilidade (Shojaei et al., 2012; Andrade et al., 2018).

Foram consideradas 170.000 IATFs, contemplando 543 reprodutores, classificados entre alta e baixa fertilidade e as raças Angus e Nelore. O grupo Angus de alta fertilidade apresentou maior linearidade quando comparado com Angus de baixa e Nelore de alta fertilidade (Figura 4).

O grupo Angus de baixa fertilidade apresentou maior de ALH e BCF em comparação com os animais de alta fertilidade da mesma raça (Figura 4A, B e C).

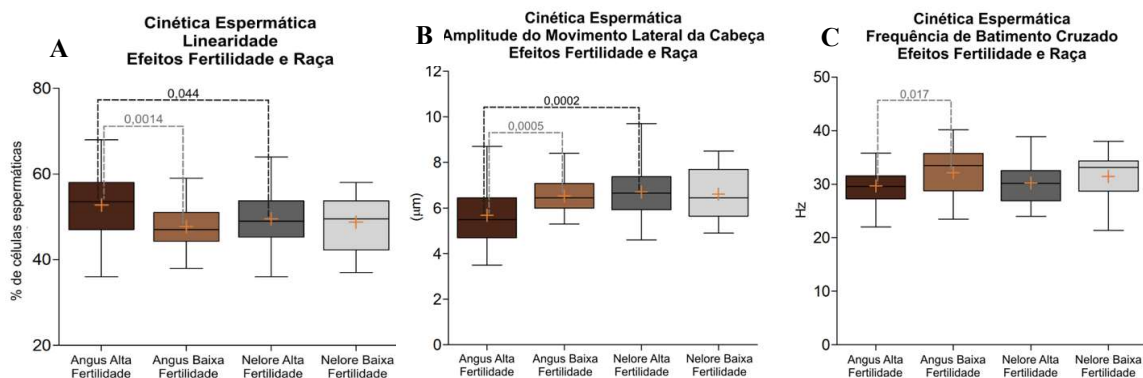


Figura 4. Análises cinéticas de espermatozoides. Os dados são apresentados como um gráfico de caixa, com mediana e intervalo interquartil; valores mínimo e máximo representados em + laranja o valor médio; as diferenças entre os grupos são representadas por linhas de conexão com os valores de P. Linearidade, Amplitude do movimento lateral da cabeça e frequência de batimento cruzado (interação raça*fertilidade). (Leite et al., 2022).

Tais diferenças cinéticas podem apontar para uma possível hiperativação precoce, o que poderia resultar em queda na taxa de fertilidade, considerando-se o tempo transcorrido entre a IA e o momento de

ovulação das fêmeas (Andrade α Moreira et al., 2018).

3- Produção *in vitro* de embriões utilizando sêmen de alta e baixa fertilidade (Zanatta et al., 2019).

Utilizados 6 touros Angus, sendo 3 de alta e 3 de baixa fertilidade, com informações obtidas por seus resultados de campo. Não houve diferença na taxa de blastocisto sobre oócitos (alta = 21,5% (160/754) *versus* baixa = 21,9% (152/693); P=0.9) e de clivagem [alta = 82,1% (619/754) *versus* baixa = 81,9% (584/713); P=0.9], taxa de blastocistos totais figura 6, 7 e 8. Na figura 9 e 10 são demonstrados as taxas de clivagens e blastocistos por touro.

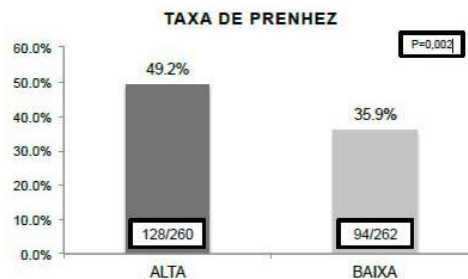


Figura 5. Taxa de prenhez conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Houve efeito na taxa de prenhez quando se utilizou touros de alta fertilidade comparado aos touros de baixa fertilidade (P=0,002) (Zanatta et al., 2019).

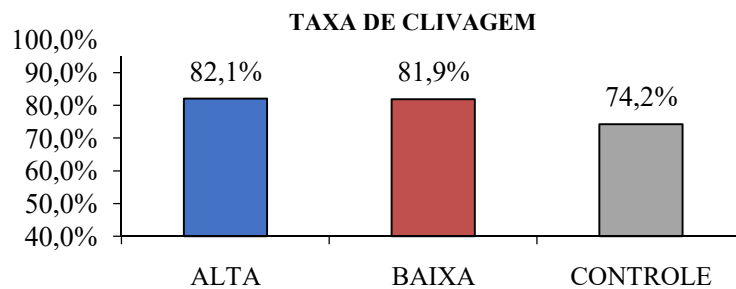


Figura 6. Taxa de clivagem (número total de estruturas clivadas sobre número total de oócitos) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Não houve efeito na taxa de clivagem conforme a fertilidade do touro (Zanatta et al., 2019).

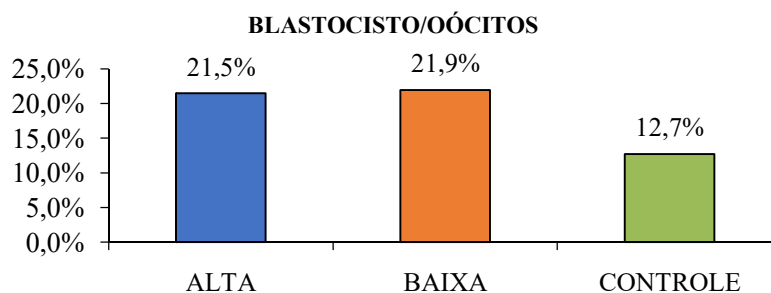


Figura 7. Taxa de blastocistos totais (número total de blastocistos sobre número total de oócitos) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Não houve efeito na taxa de blastocistos totais conforme a fertilidade do touro (P=0,9) (Zanatta et al., 2019).

- Neste experimento a produção *in vitro* de embriões não foi comprometida pelo uso de sêmen de touros menos férteis.
- Vale reforçar que no laboratório, sêmen e oócitos são colocados diretamente em contato e a capacitação é induzida por agentes capacitantes em janelas de tempo ideais para viabilizar a fertilização.
- Isto indica que para se explicar as diferenças de fertilidade entre os touros, obtidas em IATF, ganha importância o peso das características de motilidade e cinética espermáticas.

4- Efeito da cinética espermática e tamanho do folículo ovulatório na taxa de gestação após IATF em vacas de corte (Pfeifer et al., 2019).

Como o movimento da cabeça do espermatozoide depende dos padrões de dobra e batimento flagelar, os espermatozoides com VCL e ALH relativamente maiores e LIN menor são característicos de hiperativação (Mortimer & Mortimer, 1990; Marquez & Suarez, 2007; Shojaei et al., 2012). Assim, em comparação com a média do grupo estudado, partidas com VCL e ALH relativamente maiores e LIN menores foram considerados hiperativados (H+) com LIN < 53%, ALH > 7.17 µm, e VCL > 164.3 µm/s. Além disso, lotes com VCL e ALH relativamente menores e LIN maiores foram considerados não hiperativados (H-) com LIN > 53%, ALH < 7.2 µm e VCL < 164.3 µm/s.

Como em um estudo anterior (Pfeifer et al., 2015), as vacas foram categorizadas em um dos dois grupos com base no diâmetro da POF: um grupo de Ovulação Precoce (EO, n=184), no qual as vacas tiveram um FOP de ≥13 mm; e um grupo Ovulação Tardia (grupo LO, n=162), em que as vacas apresentaram FOP <13 mm.

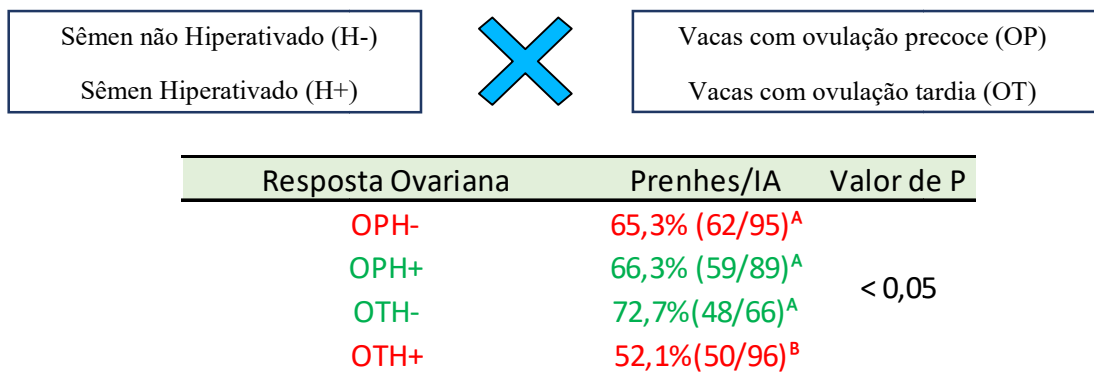


Figura 8. Taxa de prenhez de acordo com a resposta ovariana e o grau de hiperatividade do sêmen (Pfeifer et al., 2019).

Nesse sentido, conforme observado no presente estudo, o diâmetro do folículo pré-ovulatório e a cinemática espermática pós-descongelamento são fatores potenciais que afetam o sucesso do estabelecimento de uma gestação quando há uso de programas de IATF.

Probabilidade de prenhez aos 30D depois da IATF em vacas de corte inseminadas usando sêmen H+ ou H- em vacas com diferentes diâmetros dos folículos pré-ovulatórios ao momento da IATF (P=0,001).

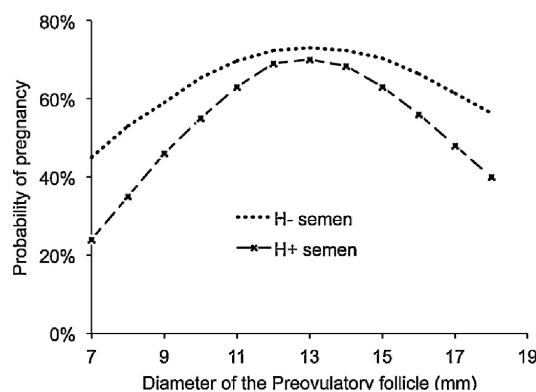


Figura 9. Probabilidade de prenhez no dia 30 após inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas de corte inseminadas com H+ (•••••) ou H-(-x-) espermatozoides em vacas com diâmetros diferentes do folículo pré-ovulatório (FOP) no IATF (P = 0,001). (Pfeifer et al., 2019).

Considerações finais

- Há fortes indicativos que, no âmbito da fertilidade de campo obtida em programas de IATF, uma

questão essencial é o entendimento de como pode ser estimada a longevidade do potencial fertilizante das células espermáticas.

- Esta questão ganha maior relevância em situações de desafio para o sêmen, notadamente quando não se obtém, nos lotes de fêmeas sincronizadas, a devida concentração de ovulações nas janelas ideais de tempo.
- Neste contexto, as análises seminais feitas no sistema CASA emergem como grande ferramenta de auxílio.
- A estimativa do status de capacitação das partidas/touros através da cinética espermática, por se correlacionar em algum grau, tanto ao nível de reserva energética dos espermatozoides, bem como da proximidade da reação acrossômica, parece contribuir significativamente nesse contexto.
- Há, portanto, evidências robustas que a cinética espermática obtida pelo sistema CASA possa compor um tripé sustentável com as aferições de motilidade e morfologia espermática, aumentando assim a acurácia das análises laboratoriais para prever fertilidade em IATF.
- E que a presença de células espermáticas menos velozes e mais lineares, por serem mais longevas, pode indicar maior expectativa de fertilidade na IATF, atendendo maior gama de cenários relativos ao potencial ovulatório das fêmeas sincronizadas.

Referências

Alves RL, Silva MA, Consentini CE, Silva LO, Folchini NP, Oliva AL, Prata AB, Gonçalves JRS, Wiltbank MC, Sartori, R. Hormonal combinations aiming to improve reproductive outcomes of *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed AI protocols. *Theriogenology*, v.169, p.89-99, 2021.

Andrade JDS, Moreira EM, da Silva GM, de Souza VL, Nunes VRR, de Oliveira Júnior JS, Pfeifer L FM. Aspectos uterinos, foliculares e seminais que afetam a IATF em vacas de corte no período pós-parto. *Embrapa Rondônia-Artigo em periódico indexado (ALICE)*, 2018.

Austin CR. Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg. *Australian Journal of Scientific Research*, v.4, p.581-596, 1951.

Bedford, J.M. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biology Reproduction*, v.28, p.108-120, 1983.

Burkman LJ. Hyperactivated motility of human spermatozoa during in vitro capacitation and implications for fertility. In Gagnon, C. (ed.), *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. CRC Press, Boca Raton, p.303-329, 1990.

Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, v.168, p.697-698, 1951.

Demott RP, Suarez SS. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biology Reproduction*, v.46, p.779-785, 1992.

Farrell PB, Foote RH, Mcardle MM, Trouem-Trend VL, Tardif AL. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *Journal of Andrology*, v.17, p.293-300, 1996.

Katz DF, Yanagimachi R. Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. *Biology Reproduction*, v.22, p.759-764, 1980.

Katz DF, Drobnis EZ, Overstreet JW. Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Resources Journal*, v.22, p.443-469, 1989.

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* 46, n.1, p.165-72, 2011.

Kumar S, Millar JD, Watson PF. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, v.46, n.3, p.246-253, 2003.

Leite RF, Agostini Losano JD, Kawai GKV, Rui BR, Nagai KK, Castiglioni VC, Nichi M. Sperm function and oxidative status: Effect on fertility in *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls when semen is used for fixed-time artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.237, p.106922, 2022.

Marquez B, Suarez SS. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca²⁺ influx. *Biology of Reproduction*, v.76, n.4, p.660-65, 2007.

Mortimer STA critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in

- mammals. *Human Reproduction Update*, v.3, n.5, p.403-439, 1997.
- Mortimer ST, Mortimer D.** Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *Journal Andrology*, v.11, p.195-203, 1990.
- Muñoz R, Tamargo C, Hidalgo CO, Peña AI.** Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science*, v.109, n.1-4, p.27-39, 2008.
- Pereira FR, de Almeida ABM, Hidalgo MMT, Potiens JR, Souza AK, Lopes FG, Martins MIM.** Relationship between viability of thawed semen and pregnancy rate of Nelore cows subjected to fixed-time artificial insemination. *Research, Society and Development*, v.10, n.2, p.e49710212184-e49710212184, 2021.
- Pfeifer LFM, Júnior JSO, Potiens JR.** Effect of sperm kinematics and size of follicle at ovulation on pregnancy rate after timed AI of beef cows. *Animal reproduction science*, v.201, p.55-62, 2019.
- Simonik O, Sichtar J, Krejcarkova A, Rajmon R, Stadnik L, Be Dolezalova M, Biniova Z.** Computer assisted sperm analysis – the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: a review. *Indian Journal of Animal Science*, v.85, p.3-11, 2015.
- Shalgi R, Smith TT, Yanagimachi RA.** quantitative comparison of the passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction. *Biology Reproduction*, v.46, p.419-424, 1992.
- Shojaei H, Kroetsch T, Wilde R, Blondin P, Kastelic JP, Thundathil JC.** 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, p.940-951, 2012.
- Suarez SS, Katz DF, Overstreet JW.** Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. *Biology Reproduction*, v.29, p.1277-1287, 1983.
- Suarez SS, Vincenti L, Ceglia MW.** Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. *Journal of Experimental Zoology*, v.244, p.331-336, 1987.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclim K.** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.
- Zanatta GM.** Produção embrionária utilizando touros de alta e baixa fertilidade. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2019.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60, p.481-492, 2000.
-