

Subpopulações de espermatozoides de carneiros submetidos a diferentes métodos de conservação do sêmen

OLIVEIRA, Matheus Batista de¹; OLIVEIRA, Davi Andrade²; MOLINA, Julio Constantino Jeri³; MARIA, Alexandre Nizio⁴, AZEVEDO, Hymerson Costa⁵

¹ Graduando em Medicina Veterinária, bolsista CNPq/PIBIC/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

² Médico Veterinário, bolsista de mestrado CAPES, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

³ Mestre em Produção Animal, bolsista de doutorado FAPITEC/SE, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

⁴ Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁵ Médico Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

Resumo – A otimização da seleção de carneiros e de sêmen para conservação pode ser alcançada com a análise de subpopulações espermáticas. Objetivou-se identificar, caracterizar, analisar a dinâmica e avaliar a influência dos métodos de conservação sobre as subpopulações de espermatozoides móveis no sêmen de carneiros. Foi utilizado um banco de dados de cinética espermática computadorizada cujos espermatozoides foram distribuídos de acordo com os grupos: sêmen fresco (138.626 espermatozoides); sêmen refrigerado (14.816 espermatozoides) e sêmen congelado (45.488 espermatozoides). Foi realizada análise multivariada (two-step cluster) para formação de clusters, aplicado o teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos dados, e análise de variância com teste post-hoc de Tukey para avaliar diferenças entre os grupos. Dados sem distribuição normal, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn. Para todos os testes foi considerado o nível de 5% de significância. Os grupos de sêmen refrigerado e sêmen congelado apresentaram apenas dois clusters enquanto o sêmen fresco apresentou três. A proporção de espermatozoides considerados rápidos, lineares e progressivos foi 81,20 % no sêmen fresco, 57,20 % no sêmen refrigerado, e 59,90% no sêmen congelado. A conservação seminal diminuiu o número de subpopulações de espermatozoides e a proporção daqueles considerados rápidos, progressivos e lineares.

Termos para indexação: cinética espermática, refrigeração do sêmen, congelamento do sêmen.

Introdução

No ejaculado, existe um grupo heterogêneo de subpopulações espermáticas distintas que variam desde padrões estruturais, como morfometria de cabeça e cauda (Vicente-Fiel et al., 2013), a funcionais, como capacidade de sofrer capacitação em condições diferentes (Harrison, 1996), e de cinética (Quintero-Moreno et al., 2003). Essa heterogeneidade aumenta as chances de os espermatozoides fertilizarem o oócito (Curry, 2000).

Para muitas outras espécies, é importante que existam diferentes subpopulações espermáticas que estejam preparadas para a fertilização em diferentes momentos (Amann et al., 1993). Esta heterogeneidade espermática, entretanto, pode ser alterada por diversos fatores, a exemplo da conservação seminal, como a congelamento (Muiño et al., 2009). Saber de que forma isto acontece e como se caracteriza é importante para estabelecer estratégias de avaliação e uso do sêmen conservado, seja refrigerado ou congelado. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo identificar, caracterizar e analisar a dinâmica de subpopulações de espermatozoides no sêmen de carneiros sob a influência dos métodos de conservação.

Material e Métodos

Foram utilizados dados de 46 carneiros da raça Santa Inês, com idade entre 10 e 58 meses, submetidos a colheitas de sêmen pelo método da vagina artificial entre 43 e 45 °C. Cada amostra de sêmen foi acondicionada em tubos graduados pré-aquecidos (37 °C), mantidos em banho-maria (32 °C) para mensuração do volume (mL), vigor espermático (0 a 5), motilidade total (MT; 0 a 100 %), concentração espermática ($\times 10^6$ spz/mL), número total de espermatozoides (NTE; $\times 10^9$ spz) e morfologia espermática (ME; % de spz sem defeitos maiores e defeitos menores), utilizando-se amostras com MT \geq 75 %, NTE \geq 3 $\times 10^9$ spz e; ME \geq 80 %.

As amostras de sêmen foram diluídas em Glicina-Gema-Leite sem (SR = sêmen refrigerado) e com a adição do glicerol (SC = sêmen congelado), envasadas em palhetas (0,25 mL) e seladas com

álcool polivinílico em pó. As amostras de SR foram submetidas à refrigeração (0,25 °C/minuto até 5 °C); as de SC, após a refrigeração, foram submetidas à congelamento (-20 °C/minuto até atingir -140 °C; TK 4000; TK Tecnologia em Congelamento Ltda, Uberaba) para posteriormente serem imersas em nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e armazenadas em botijão criogênico (-196 °C).

Amostras de sêmen fresco (SF), de SR (a 5 °C por até 72 horas e posteriormente aquecidos a 37°C) e de SC (após a descongelamento em banho-maria a 40°C/ 20 seg.) foram submetidas à avaliação computadorizada da cinética espermática (CASA). Foram analisados os parâmetros velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade do percurso médio (VAP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF) e índice de oscilação (WOB). Foram estabelecidos os seguintes critérios para a cinética espermática: espermatozoides móveis $VCL > 10 \mu\text{m}/\text{segundo}$; espermatozoides lentos $VCL < 100 \mu\text{m}/\text{segundo}$; espermatozoides rápidos $VCL \geq 200 \mu\text{m}/\text{segundo}$; espermatozoides progressivos $STR \geq 70 \%$; espermatozoides lineares $LIN \geq 40 \%$.

Para a formação dos clusters (subpopulações) foi realizada uma análise multivariada (two-step), o cálculo de log-verossimilhança e o critério bayesiano de Schwarz utilizando-se o SPSS 13.0. Em seguida, foi usado o pacote estatístico SAS (SAS Institute, Inc., 2010). Foram aplicados testes para a avaliação da normalidade (Shapiro-Wilk), comparação múltipla das médias (análise de variância) e das diferenças entre os grupos (Tukey). Para os dados sem distribuição normal, foi realizada uma comparação múltipla das medianas (Kruskal-Wallis) e das diferenças entre os grupos (Dunn). O nível de significância considerado nas análises foi de 5%.

Resultados e Discussão

Nas Tabela 1 e 2, estão expostos as quantidades e valores médios dos parâmetros cinéticos e as proporções de espermatozoides nas subpopulações (cluster) de cada grupo experimental. O SF apresentou a formação de três clusters, sendo o 1 e o 2 caracterizados por apresentarem células espermáticas rápidas, lineares e progressivas, representando 81,20% do total de espermatozoides do SF. Já o cluster 3 do grupo SF apresentou menor proporção dos espermatozoides que foram considerados com velocidade mediana, não-lineares e não-progressivos.

Os grupos de amostras de sêmen conservados (SR e SC), apresentaram número igual de subpopulações, porém menor que no SF. Os clusters 1 do SR e SC apresentaram espermatozoides rápidos, lineares e progressivos e representaram mais da metade dos espermatozoides destas amostras. Os clusters 2 destes grupos foram caracterizados por células espermáticas consideradas lentas, não-lineares e não-progressivas e representaram menos da metade dos espermatozoides destas amostras. Apesar do SC ter apresentado um menor número de subpopulações do que o SF, a subpopulação com maior proporção do SC apresentou médias superiores na maioria dos parâmetros cinéticos em comparação a maior subpopulação do SF.

Foi observado por Muiño et al. (2008) que a criopreservação modificou significativamente a distribuição de espermatozoides dentro das subpopulações de touros holandeses, situação que corrobora com a observada no nosso estudo. Ainda segundo esses autores, aquelas subpopulações compostas majoritariamente por espermatozoides com maior velocidade e progressividade foram positivamente correlacionadas com a resistência à criopreservação.

A análise da proporção de subpopulações de espermatozoides com alta velocidade, de maior linearidade e mais progressivos pode ser usada como uma ferramenta poderosa para mensurar a capacidade de fertilização de um animal (Bravo et al., 2011) ou amostra seminal. Espermatozoides com maior velocidade em linha reta podem melhorar o transporte espermático através do trato reprodutivo e na penetração do oócito (Gillan et al., 2008). Esse transporte no trato reprodutivo da fêmea é caracterizado por um deslocamento rápido dos espermatozoides em um curto período até a chegada ao local de fertilização, e pela formação de reservatórios, que promovem a liberação prolongada destas células (Hafez, 1995). Assim, o sêmen com uma maior proporção de espermatozoides com parâmetros cinéticos de maior velocidade, linearidade e progressividade são mais eficientes e capazes de atravessar a barreira de muco do trato reprodutivo da fêmea (Yániz et al., 2015).

O tempo de incubação da amostra em determinados meios (Ramió et al., 2008) e a adição de substâncias que induzem a capacitação (Garcia-Alvarez et al., 2014) podem permitir uma equiparação das características cinéticas de algumas subpopulações espermáticas específicas do SC com aquelas

encontradas no SF. A incubação de amostras de espermatozoides em meios que induzem a capacitação leva a mudanças que são consistentes com um aumento na proporção de espermatozoides viáveis com alta fluidez de membrana, bem como um aumento na subpopulação de espermatozoides caracterizada por um padrão de motilidade do tipo hiperativado, os quais são requisitados para técnicas de fertilização *in vitro* (FIV), mas não necessariamente para a reprodução natural (Garcia-Alvarez et al., 2014).

A heterogeneidade espermática pode potencializar a capacidade fecundante do sêmen aumentando as chances de um ejaculado ou amostra de ter sucesso na reprodução natural, inseminação artificial, FIV (Amann et al., 1993) ou outras biotecnologias. Assim, a identificação e caracterização de subpopulações de espermatozoides proporcionam melhorias nas técnicas de avaliação da qualidade seminal, potencializando os procedimentos de seleção de reprodutores e de amostras de sêmen fresco e conservado para uso na reprodução (Yániz et al., 2015).

Conclusões

A quantidade e as características cinéticas das subpopulações espermáticas de carneiros são influenciadas pelos métodos de conservação do sêmen. O número de subpopulações de espermatozoides móveis é menor em amostras seminais submetidas à refrigeração e à congelamento em relação ao sêmen fresco. A conservação seminal diminui a proporção das subpopulações espermáticas consideradas rápidas, progressivas e lineares.

Tabela 1. Caracterização das subpopulações de espermatozoides móveis obtidas pela análise cinética espermática computadorizada (CASA) do sêmen de carneiros Santa Inês submetidos a diferentes métodos de conservação seminal. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Grupo	Cluster	Parâmetros Cinéticos Espermáticos							
		VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)	WOB (%)
SF	1	304,32 \pm 73,37 ^b	138,94 \pm 47,12 ^b	179,63 \pm 39,16 ^b	46,67 \pm 13,73 ^b	77,43 \pm 18,72 ^b	3,71 \pm 0,88 ^b	45,46 \pm 11,34 ^b	59,85 \pm 7,42 ^b
	2	308,13 \pm 77,06 ^a	132,56 \pm 47,90 ^c	177,10 \pm 39,63 ^c	44,13 \pm 14,16 ^c	74,84 \pm 19,63 ^c	3,81 \pm 0,93 ^a	43,57 \pm 11,94 ^c	58,41 \pm 7,72 ^c
	3	126,77 \pm 62,58 ^d	22,95 \pm 21,08 ^e	58,93 \pm 33,48 ^e	17,59 \pm 15,48 ^d	35,71 \pm 26,12 ^e	1,95 \pm 0,82 ^e	13,04 \pm 8,90 ^e	46,09 \pm 13,23 ^e
SR	1	214,64 \pm 7,83 ^e	93,61 \pm 32,40 ^d	119,60 \pm 2,53 ^d	44,98 \pm 11,75 ^c	77,97 \pm 14,01 ^b	3,10 \pm 0,94 ^c	31,93 \pm 12,09 ^d	57,33 \pm 9,24 ^d
	2	72,10 \pm 42,10 ^f	13,04 \pm 12,24 ^f	31,73 \pm 21,70 ^f	17,00 \pm 13,00 ^d	38,30 \pm 23,62 ^d	1,35 \pm 0,60 ^f	6,89 \pm 6,61 ^g	42,89 \pm 17,20 ^g
SC	1	291,48 \pm 101,36 ^c	171,57 \pm 88,68 ^a	206,55 \pm 89,55 ^a	58,76 \pm 17,21 ^a	82,63 \pm 16,65 ^a	2,94 \pm 0,92 ^d	47,62 \pm 12,26 ^a	70,57 \pm 12,20 ^a
	2	69,16 \pm 46,72 ^g	12,00 \pm 14,75 ^g	33,20 \pm 28,47 ^f	15,80 \pm 13,24 ^c	33,24 \pm 22,46 ^f	1,20 \pm 0,60 ^g	7,03 \pm 7,86 ^f	45,81 \pm 17,05 ^f

SF: sêmen fresco; SR: sêmen refrigerado; SC: sêmen congelado; VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade em linha reta; VAP: velocidade do percurso médio; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência do batimento flagelar cruzado; WOB: índice de oscilação. Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$).

Tabela 2. Proporção de subpopulações (cluster) de espermatozoides móveis no sêmen de carneiros Santa Inês submetidos a diferentes métodos de conservação seminal.

Subpopulação de espermatozoides (sptz)	Grupos		
	SF % (n sptz)	SR % (n sptz)	SC % (n sptz)
Cluster 1	46,40 (64.372)	57,20 (8.481)	59,90 (27.240)
Cluster 2	34,80 (48.211)	42,80 (6.335)	40,10 (18.248)
Cluster 3	18,80 (26.043)	-	-
Total	100 (138.626)	100 (14.816)	100 (45.488)

SF: sêmen fresco; SR: sêmen refrigerado; SC: sêmen congelado; n sptz: número de espermatozoides.

Agradecimentos

À Embrapa, pelo apoio financeiro e de infraestrutura, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e à Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE), pelas bolsas de estudo.

Referências

- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; VEERAMACHANENI, D. N. The epididymis and sperm maturation: a perspective. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 4, p. 361–381, 1993.
- BRAVO, J. A.; MONTANERO, J.; CALERO, R.; ROY, T. J. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 1–2, p. 22–29, 2011.
- CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n. 1, p. 46–52, 2000.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; OLMO, E. DEL; JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ANEL-LÓPEZ, L.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support in vitro capacitation and fertilisation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 5, p. 725–732, 2014.
- GILLAN, L.; KROETSCH, T.; CHIS MAXWELL, W. M.; EVANS, G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 103, n. 3–4, p. 201–214, 2008.
- HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**, 6. ed., Manole Ltda: São Paulo, 1995. 582 p.
- HARRISON, R. A. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 4, p. 581–594, 1996.
- MUIÑO, R.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; PEÑA, A. I. 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, p. 27-39, 2008.
- MUIÑO, R.; PEÑA, A. I.; RODRÍGUEZ, A.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. **Theriogenology**, v. 72, n. 6, p. 860–868, 2009.
- QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; TERESA RIGAU, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology**, v. 59, n. 9, p. 1973–1990, 2003.
- RAMIÓ, L.; RIVERA, M. M.; RAMÍREZ, A.; CONCHA, I. I.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to “in vitro” capacitation and further “in vitro” acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 69, n. 4, p. 501–512, 2008.

VICENTE-FIEL, S.; PALACÍN, I.; SANTOLARIA, P.; YÁÑIZ, J. L. A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). **Animal Reproduction Science**, v. 139, n. 1–4, p. 182–189, 2013.

YÁÑIZ, J. L.; PALACÍN, I.; VICENTE-FIEL, S.; SÁNCHEZ-NADAL, J. A.; SANTOLARIA, P. Sperm population structure in high and low field fertility rams. **Animal Reproduction Science**, v. 156, p. 128–134, 2015.