

Subpopulações de espermatozoides móveis no sêmen de carneiros submetidos a diferentes critérios de seleção

COSTA, Paulo Henrique Conceição¹, OLIVEIRA, Davi Andrade², MOLINA, Julio Constantino Jerri³, 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 (UFS) Aracaju, SE.

³ Médico Veterinário, bolsista de doutorado FAPITEC Universidade Federal de Sergipe (UFS), Aracaju, 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 – Objetivou-se identificar, caracterizar e analisar a dinâmica de subpopulações de espermatozoides móveis no sêmen fresco de carneiros (SF) sob a influência de critérios de seleção de reprodutores. A partir de um banco de dados de análise da cinética computadorizada, 277.302 espermatozoides foram distribuídos nos seguintes grupos: SF de carneiros sem nenhuma seleção (SF-T); SF de carneiros selecionados (S) por exame andrológico (SF-S); e SF-S de carneiros jovens com idade entre 10 e 18 meses (SF-S \leq 18) e adultos entre 19 e 58 meses (SF-S $>$ 18). Os dados foram submetidos à análise multivariada *Two-Step Cluster* seguida pelo teste de Kruskal-Wallis (P $<$ 0,05). Os grupos variaram no número de subpopulações espermáticas (SF-T=3, SF-S=3, SF-S \leq 18=2 e SF $>$ 18=4) e nas proporções de espermatozoides nos clusters. Espermatozoides rápidos, lineares e progressivos agruparam-se nos clusters 1 e 2 do SF-T e SF-S, no cluster 1 do SF-S \leq 18 e nos clusters 1, 2 e 3 do SF-S $>$ 18. Conclui-se que a quantidade e as características cinéticas das subpopulações espermáticas no sêmen fresco não são influenciadas pelo exame andrológico, mas sim pela faixa etária dos carneiros. O número de subpopulações de espermatozoides móveis no sêmen fresco é maior em carneiros adultos do que em jovens.

Termos para indexação: ovinos, Santa Inês, exame andrológico, idade, cluster.

Introdução

A puberdade é caracterizada pelo aparecimento de espermatozoides vivos e viáveis (Pacheco et al., 2012), enquanto a maturidade sexual, por mudanças morfológicas, como o grau de desprendimento da aderência peniana, alterações seminais e do comportamento sexual. Sobre as características do sêmen, a idade do carneiro é um dos fatores que pode afetar a concentração, viabilidade, motilidade e morfometria dos espermatozoides (Martí et al., 2011), dentre outros parâmetros.

O andrológico é uma ferramenta para mensurar estes parâmetros seminais e é feito através do exame clínico (anamnese, exame clínico geral e específico do sistema genital, escroto, testículos, epidídimos, cordões espermáticos, prepúcio, pênis, órgãos genitais internos, biometria testicular e comportamento sexual) e do espermograma (características físicas do ejaculado e funcionais e morfológicas dos espermatozoides) (EMBRAPA, 2019).

Amostras de sêmen de carneiros devem ser o mais heterogêneas possível, a fim de aumentar as chances de conterem espermatozoides preparados para enfrentar as variações externas durante o seu uso na reprodução natural e em biotecnologias da reprodução e, assim, aumentar as chances de fertilizarem o oócito (Curry, 2000). A heterogeneidade do sêmen quanto à diversidade das suas subpopulações espermáticas pode ser definida a partir da avaliação da cinética, integridade de membranas, potencial mitocondrial e morfologia, dentre outras análises dos espermatozoides. A análise de subpopulações espermáticas consiste na avaliação da coexistência de diferentes espermatozoides agrupados por similaridades (Rodrigues, 2017).

A associação da avaliação computadorizada da cinética espermática à análise estatística multivariada tem possibilitado a análise objetiva, simultânea e conjugada de muitos parâmetros cinéticos, identificando e caracterizando agrupamentos de espermatozoides móveis no sêmen, pela formação de clusters que representam diferentes subpopulações (Kanno et al., 2017). Essa associação de ferramentas possibilita que sejam determinados número, proporções e características de subpopulações de espermatozoides com diferentes comportamentos cinéticos em amostras de sêmen, tornando-se uma potente ferramenta de sua avaliação.

O objetivo desse trabalho foi identificar, caracterizar e analisar a dinâmica de subpopulações de espermatozoides móveis no sêmen fresco *in natura* de carneiros sob a influência de critérios de seleção de reprodutores.

Material e Métodos

Foram utilizados dados de 47 carneiros da raça Santa Inês com idade entre 10 e 58 meses, mantidos em sistema semi-intensivo. Para a colheita do sêmen, o método usado foi a vagina artificial entre 43-45°C, utilizando-se como estímulo sexual, uma fêmea em estro natural. O ejaculado foi coletado em tubos graduados pré-aquecidos (37°C) e em seguida foram avaliados no estado fresco *in natura*.

Os carneiros e seus ejaculados foram previamente analisados seguindo os procedimentos e critérios básicos de exame andrológico recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) para avaliação dos carneiros quanto à aptidão para reprodução. Para o sêmen foram avaliados o volume (mL), vigor espermático (0 a 5), motilidade espermática total (0 a 100%), concentração espermática ($\times 10^6$ spz/mL) e número total de espermatozoides ($\times 10^9$ spz).

Amostras de sêmen foram submetidas à avaliação computadorizada da cinética espermática. Alíquotas foram diluídas em uma solução avaliadora pré-aquecida (37°C), a uma concentração de 20×10^6 spz/mL. Depois foram homogeneizadas e mantidas a 37°C por 5 min, e em seguida transferidas para câmaras de Makler®, pré-aquecidas (37°C), para captura e análise de imagens por meio de uma câmera de vídeo conectada a um microscópio com contraste de fase (100x).

Foram analisados os seguintes parâmetros de cinética espermática: motilidade total (MT); velocidades curvilínea (VCL), em linha reta (VSL) e do percurso médio (VAP); linearidade (LIN); retilinearidade (STR); amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH); frequência do batimento flagelar cruzado (BCF) e; índice de oscilação ou wobble (WOB). As células com $VCL < 100 \mu\text{m}/\text{seg}$ foram consideradas lentas e as rápidas, com $VCL \geq 200 \mu\text{m}/\text{seg}$. Espermatozoides com $STR \geq 70\%$ foram considerados progressivos e com $LIN \geq 40\%$ com movimento linear.

Os dados da cinética espermática foram divididos em grupos experimentais formados a partir de carneiros que atendiam a critérios etários (≤ 18 ou > 18 meses de idade) baseados no estudo de Mandiki et al. (1998), onde a maturidade sexual dos carneiros foi alcançada aos 17 e 18 meses de idade, e a critérios andrológicos, tais como, ejaculados com número total de espermatozoides $\geq 3 \times 10^9$, motilidade espermática avaliada subjetivamente $\geq 75\%$ e percentual de espermatozoides com morfologia normal $\geq 80\%$, que caracterizaram os carneiros como aptos à reprodução segundo o CBRA (2013). Assim, os grupos foram divididos em: SF-T - sêmen fresco (SF) de carneiros sem seleção etária e andrológica e suas subdivisões; SF-S - sêmen fresco de carneiros selecionados (S) pelos critérios andrológicos e; SF-S ≤ 18 - sêmen fresco de carneiros contemporâneos e jovens (10 a 18 meses de idade) e SF-S > 18 - sêmen fresco de carneiros não contemporâneos e adultos (> 18 meses de idade), ambos selecionados pelos critérios andrológicos.

Os dados dos parâmetros cinéticos foram submetidos à análise multivariada *Two-Step Cluster*, disponível no software SPSS 13.0. Levaram-se em consideração a distância entre os grupos através do cálculo de log-verossimilhança e o critério bayesiano de Schwarz (BIC), os quais auxiliam a formação dos clusters dentro de cada grupo experimental. Em seguida à definição dos clusters, as médias de cada parâmetro foram comparadas entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$), a fim de diferenciar as subpopulações espermáticas entre os grupos experimentais.

Resultados e discussão

Na Tabela 1 estão expostos a quantidade e os valores médios dos parâmetros cinéticos dos espermatozoides das subpopulações (clusters). Os grupos de sêmen fresco (SF) de carneiros sem seleção etária e andrológica (SF-T) e sêmen fresco de carneiros selecionados pelos critérios andrológicos (SF-S) apresentaram a formação de três clusters cada um. Os clusters 1 e 2 juntos, representaram 81,2% e 82,9% da população espermática destes grupos respectivamente, apresentando espermatozoides rápidos, lineares e progressivos. Já os clusters 3 de ambos os grupos, representaram 18,8% e 17,0% dos espermatozoides caracterizados por movimento com velocidade mediana, não lineares e não progressivos.

No grupo SF-S ≤ 18 , sêmen fresco de carneiros contemporâneos e jovens selecionados pelos critérios andrológicos, foi observada a formação de apenas dois clusters, sendo o de número 1

caracterizado por espermatozoides rápidos, lineares e progressivos na proporção de 77,9%, enquanto o 2 caracterizou-se por conter células lentas, não lineares e não progressivas em menor proporção (22,1%). No grupo SF-S>18, sêmen fresco de carneiros não contemporâneos e adultos (> 18 meses de idade) selecionados pelos critérios andrológicos, foi observada a formação de quatro clusters, sendo que os de número 1, 2 e 3 contiveram células espermáticas rápidas, lineares e progressivas na proporção total de 84,2%, enquanto o cluster 4 foi caracterizado por conter células com velocidade mediana não lineares e não progressivas representando 15,8% do total de espermatozoides.

Ao agrupar carneiros jovens e contemporâneos, provavelmente formou-se um grupo mais homogêneo quanto ao nível de exposição a condições ambientais e de manejo que afetam a fisiologia e consequentemente o potencial reprodutivo. Animais mais jovens são, na maioria das vezes, menos expostos a variáveis externas do que os mais maduros e, desse modo, podem ter menos diversidade quanto às características reprodutivas, entre elas as seminais e por conseguinte as espermáticas.

Embora tenha apresentado valores cinéticos médios significativamente inferiores ao grupo SF-T, o grupo SF-S apresentou o mesmo número de subpopulações espermáticas e proporções semelhantes de espermatozoides rápidos, lineares e progressivos (cluster 1 e 2). Sendo assim, a seleção andrológica dos carneiros usando critérios recomendados pelo CBRA (2013) não alterou a heterogeneidade quanto à cinética espermática no sêmen de carneiros.

Este é o primeiro estudo comparativo das alterações em subpopulações de espermatozoides móveis no sêmen fresco de carneiros, advindas da seleção etária e andrológica, de reprodutores.

Tabela 1. Caracterização e comparação entre as subpopulações de espermatozoides móveis obtidas pela análise cinética espermática computadorizada (CASA) do sêmen de carneiros Santa Inês submetidos a critérios de seleção etária e andrológica. 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-T	1	304,3 \pm 73,37 ^d	138,94 \pm 47,12 ^b	179,63 \pm 39,16 ^c	46,67 \pm 13,73 ^c	77,43 \pm 18,72 ^c	3,71 \pm 0,88 ^d	45,46 \pm 11,34 ^b	59,85 \pm 7,42 ^b
	2	308,1 \pm 77,06 ^c	132,56 \pm 47,90 ^d	177,10 \pm 39,63 ^e	44,13 \pm 14,16 ^{de}	74,84 \pm 19,63 ^d	3,81 \pm 0,93 ^c	43,57 \pm 11,94 ^d	58,41 \pm 7,72 ^d
	3	126,7 \pm 6 2,58 ^g	22,95 \pm 21,08 ^h	58,93 \pm 33,48 ⁱ	17,59 \pm 15,48 ^h	35,71 \pm 26,12 ^g	1,95 \pm 0,82 ^h	13,04 \pm 8,90 ^g	46,09 \pm 13,23 ^f
SF-S	1	310,2 \pm 74,43 ^b	133,78 \pm 48,28 ^c	178,42 \pm 39,61 ^d	44,05 \pm 13,98 ^e	74,92 \pm 19,63 ^d	3,86 \pm 0,91 ^b	43,42 \pm 11,70 ^d	58,28 \pm 7,42 ^d
	2	286,6 \pm 77,42 ^e	130,40 \pm 46,72 ^f	168,57 \pm 41,56 ^g	46,55 \pm 13,55 ^c	77,42 \pm 18,47 ^c	3,55 \pm 0,86 ^f	44,00 \pm 11,88 ^c	59,70 \pm 7,60 ^{bc}
	3	112,4 \pm 58,41 ^h	17,21 \pm 17,10 ⁱ	49,86 \pm 30,07 ^j	14,69 \pm 13,70 ^j	31,30 \pm 24,61 ⁱ	1,78 \pm 0,78 ⁱ	10,88 \pm 8,01 ^h	43,64 \pm 13,65 ^g
SF-S \leq 18	1	267,61 \pm 67,70 ^f	124,06 \pm 40,71 ^f	157,36 \pm 37,08 ^h	47,30 \pm 12,49 ^b	79,01 \pm 16,95 ^b	3,44 \pm 0,80 ^g	42,53 \pm 11,13 ^e	59,56 \pm 7,35 ^c
	2	83,17 \pm 50,26 ⁱ	11,84 \pm 15,42 ^j	35,06 \pm 27,09 ^k	12,58 \pm 13,98 ^k	28,18 \pm 25,81 ^j	1,39 \pm 0,70 ^j	7,58 \pm 7,63 ⁱ	39,83 \pm 16,71 ^h
SF-S>18	1	319,89 \pm 75,97 ^a	154,30 \pm 44,21 ^a	191,60 \pm 37,46 ^a	49,31 \pm 12,30 ^a	80,54 \pm 15,89 ^a	3,74 \pm 0,86 ^d	49,01 \pm 10,55 ^a	60,92 \pm 7,19 ^a
	2	320,06 \pm 71,04 ^a	132,89 \pm 48,64 ^{cd}	181,46 \pm 38,22 ^b	42,31 \pm 13,90 ^f	73,16 \pm 20,31 ^e	4,00 \pm 0,88 ^a	42,64 \pm 11,67 ^e	57,33 \pm 7,09 ^e
	3	286,82 \pm 76,20 ^c	113,92 \pm 46,39 ^g	162,28 \pm 39,50 ^g	41,08 \pm 15,09 ^g	70,67 \pm 21,85 ^f	3,70 \pm 0,95 ^e	39,81 \pm 11,64 ^f	57,55 \pm 7,92 ^e
	4	127,06 \pm 56,55 ^g	21,31 \pm 19,03 ^h	57,95 \pm 29,4 ⁱ	16,69 \pm 14,4 ⁱ	34,16 \pm 24,76 ^h	1,97 \pm 0,74 ^h	12,87 \pm 8,15 ^g	45,98 \pm 11,76 ^f

SF-T: sêmen fresco sem seleção; SF-S: sêmen fresco de carneiros selecionados por critérios andrológicos; SF-S \leq 18: sêmen fresco de carneiros contemporâneos e jovens selecionados por critérios andrológicos; SF-S $>$ 18: sêmen fresco de carneiros não contemporâneos e adultos selecionados por critérios andrológicos; 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 ou Wobble. Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si (P $<$ 0,05).

Conclusões

A quantidade e as características cinéticas das subpopulações espermáticas no sêmen fresco de carneiros não são influenciadas pelo exame andrológico e sim pela idade. O número de subpopulações de espermatozoides móveis no sêmen fresco é maior em carneiros adultos do que em jovens.

Agradecimento

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.; HAMMERSTEDT, R.; VEERAMACHANENI, D. The epididymis and sperm maturation: a perspective. **Reproduction, Fertility and Development**; v. 5, p. 361–381, 1993.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. CBRA. 2013. 104 p.
- CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n. 1, p. 46-52, 2000.
- EMBRAPA. **Uma revisão sobre a execução do exame andrológico nos carneiros**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2019 (EMBRAPA Pecuária Sul. Documento, 161).
- KANNO, C.; SAKAMOTO, K. Q.; YANAGAWA, Y.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S.; NAGANO, M. Comparison of sperm subpopulation structures in first and second ejaculated semen from Japanese black bulls by a cluster analysis of sperm motility evaluated by a CASA system. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 8, p. 1359-1365, 2017.
- MANDIKI, S. N. M.; DERYCKE, G.; BISTER, J. L.; PAQUAY, R. Influence of season and age on sexual maturation parameters of Texel, Suffolk and Ile-de-France rams: 1. Testicular size, semen quality and reproductive capacity. **Small Ruminant Research**, v. 28, n. 1, p. 67-79, 1998.
- MARTÍ, J. I.; APARICIO, I. M.; GARCÍA-HERREROS, M. Sperm morphometric subpopulations are differentially distributed in rams with different maturity age in cryopreserved ejaculates. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 97-109, 2011.
- PACHECO, A.; MADELLA-OLIVEIRA, A. F. E.; QUIRINO, C. Puberdade em ovinos: revisão. **PUBVET**, v. 6, art. 1441, 2012.
- RODRIGUEZ, S. A. F. **Impacto da qualidade espermática sobre a fertilidade in vivo em bovinos: contribuição de marcadores mitocondriais e subpopulações espermáticas**. 2017. 181 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.