

MORFOMETRIA DA CABEÇA ESPERMÁTICA E CORRELAÇÃO COM DEMAIS VARIÁVEIS SEMINAIS EM TOUROS NELORE COM ALTERAÇÕES NA ESPERMIOGÊNESE

AUTORES

Carlos E. Fernandes¹, Antônio Emídio D. F. Silva ¹, Hymerson C. Azevedo ¹, Sony Dimas Bicudo ¹,
Alexandra R. Oliveira², Simone C. P. Lopes¹ & Sheila S. Moraes²

¹ FMVZ-UNESP, Botucatu CEP18618-000, Distrito de Rubião Jr, Botucatu, SP

² Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262, Km 4, CEP 79002-970, Campo Grande, MS

RESUMO

Touros Nelore (n=10), com histórico seminal conhecido e mantidos em condições extensivas foram classificados de acordo em aptos (AP, n=4) e não aptos (NAP, n=6). Após colheita por eletroejaculação o sêmen foi avaliado quanto a motilidade, vigor, morfologia espermática, fragmentação nuclear (análise citoquímica) e morfometria da cabeça espermática (comprimento, largura, base e área total, excluindo os com defeitos de cabeça). Todas as medidas morfométricas foram inferiores ($p < 0,01$) para os touros classificados como NAP, sugerindo variações na conformação nuclear oriundas da espermiogênese. A análise da correlação revelou que os touros com melhor qualidade seminal (AP) apresentaram parâmetros mais homogêneos quanto a morfometria espermática. Porém, para os touros com menor qualidade seminal houve maior correlação entre parâmetros morfométricos e seminais, mostraram que a presença de espermatozoides mais largos na região superior ($r=0,48$) de maior comprimento ($r=0,42$) ou de menor base ($r=-0,48$) foram mais suscetíveis à fragmentação nuclear. A morfometria espermática favorece análises mais detalhadas do espermatozóide e pode ser útil na elucidação de vários fenômenos que afetam a espermatogênese. As correlações encontradas com a fragmentação nuclear mostram a necessidade da introdução de métodos mais acurados para a avaliação seminal.

PALAVRAS-CHAVE

Bovino, sêmen, morfometria espermática

TITLE

SPERM HEAD MORPHOMETRY AND ASSOCIATION WITH SEMINAL VARIABLES IN NELORE BULLS WITH DISTURBANCES OF SPEMIOGENESIS

ABSTRACT

Nelore bulls (n=10) with seminal historical known and maintained in extensive conditions were classified in acceptable (AC, n=4) and not acceptable (NAC, n=6). After collect for electroejaculation the semen was evaluated for the motility, vigor, sperm morphology, nuclear fragmentation (cytochemistry analysis) and different measurements of the sperm head (length, width, base and total area, excluding the head's defects). All the morphometrics measures were lower ($p < 0,01$) for the NAP bulls, suggesting variations in the nuclear configuration originating from spermiogenesis. The analysis of the correlation revealed that bulls with better seminal quality (AC) presented sperm morphometry more homogeneous. However, for the NAC bulls there was larger correlation among morphometrics parameters and seminal variables. They showed that the superior width ($r=0,48$) length ($r=0,42$) and base measurements ($r=-0,48$) were more susceptible to the nuclear fragmentation. The sperm morphometry allow more detailed analyses of the spermatozoa and it can be useful in the elucidation of several phenomena that affect the spermiogenesis. The correlations found with the nuclear fragmentation demonstrate the need of the more accurate methods for the seminal evaluation.

KEYWORDS

Bovine, semen, sperm morphometry

INTRODUÇÃO

A morfologia espermática é essencial para estimar a fertilidade potencial do macho. Dentre os diferentes defeitos observados, as variações na forma, tamanho e contorno da cabeça espermática têm sido amplamente estudados em função de sua relação com a organização e disposição da cromatina nuclear (Ballachey et al. 1988).

Durante a segunda metade da espermiogênese o núcleo das espermátides sofre duas profundas transformações. A primeira envolve a reconfiguração da matriz nuclear decorrente da mudança do formato esférico para alongado, único e característico para cada espécie. A segunda, refere-se a substituição das histonas por protaminas (P1 no touro), proteínas responsáveis por conferir maior compactação, resistência física e química ao núcleo espermático. Mais tarde, próximo à espermiacção, a teca perinuclear confere o formato final da cabeça do espermatozóide (Dadoune, 2003). Porém, muitos espermatozóides considerados com a morfologia normal apresentam alterações na integridade nuclear, não são identificados nos exames convencionais e podem estar associados à redução da fertilidade (Bochenek et al., 2001).

O objetivo deste estudo foi de avaliar diferentes medidas da cabeça espermática (análise morfométrica) e associa-las as demais variáveis seminais, incluindo o grau de fragmentação nuclear em touros com alterações na espermiogênese.

MATERIAL E MÉTODOS

Touros Nelore (n=10) mantidos em condições extensivas (Embrapa-CNPGC, Campo Grande, MS), com idade entre 30 e 40 meses, sem histórico reprodutivo, foram classificados em aptos (AP, n=4) e não aptos (NAP, n=6) após pelos menos cinco exames de sêmen, segundo Feliciano Silva et al. (1993) Os animais foram submetidos a colheita de sêmen por eletroejaculação, sendo que em seguida procedeu-se o exame imediato da motilidade (%) e vigor (0-5) em lâmina e lamínula (microscopia de campo claro). Amostras de sêmen foram preservadas em formol salino tamponado (1%) e avaliadas posteriormente para a morfologia espermática em microscopia de contraste de fase (1000 x) com preparações úmidas. Nesta análise, considerou-se o percentual em 200 células de espermatozóides morfologicamente normais, com defeitos de cabeça (piriforme, cratera, subdesenvolvido, micro e macrocefálico e contorno irregular), acrossomo (granular, vesiculoso, destacado e dobrado), peça intermediária (fraturada, dobrada, hipoplásica, engrossada e desnuda), gota citoplasmática proximal, cauda (fortemente dobrada, retro-axial), cabeça destacada (contorno e forma normais). Para a determinação do percentual de fragmentação nuclear, esfregaços de sêmen foram fixados em formalina 10% e posteriormente em solução de ácido clorídrico 5N por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, secas e mergulhadas em ácido periódico 0,5% por 10 minutos, lavadas novamente e mantidas em solução de Schiff por 1 hora. Após, os esfregaços foram lavados e secos em temperatura ambiente e cobertos com lamínula (montagem com Enthalan). As leituras foram feitas em microscopia de contraste de fase (1000 x) considerando fragmentados os núcleos com halos ou vacúolos visíveis geralmente esbranquiçados, pouca ou nenhuma coloração (células fantasmas) e presença de grânulos ou vesículas. Os percentuais foram determinados em 200 células.

Para as análises morfométricas, esfregaços de ejaculado foram corados com solução de rosa bengala a 3% e avaliados em microscopia de campo claro sob imersão, excluindo-se espermatozóides com defeitos de cabeça. As medidas foram tomadas de vários campos microscópicos selecionados ao acaso, a partir de imagens captadas digitalmente e armazenados no software Kontron Elektronik Imaging System, KS400-2.0 (GmbH). Foram determinadas medidas do comprimento, largura superior (na região da maior medida) e largura inferior (na região da base espermática) em μm e área total em μm^2 pela equação: $\text{área} = (\text{largura superior} \times \text{largura inferior}) / 2 \times \text{comprimento}$.

O efeito da classificação dos touros (AP x NAP) sobre as diferentes variáveis seminais e medidas morfométricas foi estimado pela análise de variância, modelo ao acaso ajustado para touro (Duncan, $p < 0,01$). Para as correlações utilizou-se o método de Pearson ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na seleção dos indivíduos esperava-se diferenças entre os grupos já que a qualidade seminal era conhecida (Tabela 1). Com exceção dos defeitos de cauda, as demais variáveis seminais foram significativamente diferentes para os touros NAP, especialmente para os defeitos de cabeça e fragmentação nuclear. Assim, o foco das análises direcionou-se não apenas para os percentuais obtidos entre as classificações mas, sobretudo, nos resultados da morfometria e correlação com as variáveis seminais dentro de cada classificação (tabela 2).

Todas as medidas usadas para a cabeça espermática foram inferiores ($p < 0,01$) para os touros classificados como NAP, sugerindo variações na reconfiguração nuclear ao longo da espermiogênese (Dadoune, 2003). Por exemplo, em relação à área, os touros apresentaram média de $31,0 \pm 0,11 \mu\text{m}^2$, o que representa, por estimativa, um valor 13,4% menor do que os touros AP. Pelos exames convencionais tais diferenças são praticamente impossíveis de serem percebidas, sendo considerados apenas os percentuais de células visualmente deformadas, neste caso expressas pelos defeitos de cabeça ($1,4 \pm 0,04 \times 13,0 \pm 0,25\%$ para AP x NAP, respectivamente). Portanto, é provável que a magnitude das variações do contorno, formato e tamanho do núcleo espermático sejam menores quando avaliados por critérios visuais.

A análise da correlação revelou que os touros com melhor qualidade seminal (AP) apresentaram parâmetros mais homogêneos quanto a morfometria espermática, ou seja, as correlações foram mais expressivas com o comprimento, especialmente para a população de células com núcleos fragmentados ($r = -0,33$). Considerando diferentes classificações baseadas na amplitude harmônica de medidas do núcleo espermático, Ostermeier et al. (2001) verificaram que a estabilidade da cromatina nuclear é mais freqüente nos touros que apresentam núcleos mais largos na região distal e mais finos na região proximal. Neste ensaio, os touros com menor qualidade seminal apresentaram maior correlação entre parâmetros morfométricos e seminais. Além dos defeitos de cabeça, os defeitos de acrossomo, gota citoplasmática proximal e de cauda correlacionaram-se com a morfometria, indicando a presença de mais do que um defeito específico em cada espermatozóide avaliado. Ainda, as correlações encontradas mostraram que a presença de espermatozoides mais largos na região superior ($r = 0,48$) de maior comprimento ($r = 0,42$) ou de menor base ($r = -0,48$) foram mais suscetíveis à fragmentação nuclear, corroborando com as observações de Ostermeier et al. (2001).

CONCLUSÕES

A morfometria espermática favorece análises mais detalhadas do espermatozóide e pode ser útil na elucidação de vários fenômenos que afetam a espermiogênese. As correlações encontradas com a fragmentação nuclear mostram a necessidade da introdução de métodos mais acurados para a avaliação seminal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALLACHEY, B. E.; EVENSON, D. P.; SAACKE, R. G. The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *Journal Andrology*, v. 9, p. 109-115. 1988. .
2. BOCHENEK, M.; SMORAG, Z. & PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*, v. 56, p.557-567. 2001..
3. DADOUNE, J. P. . [Expresión of mammalian spermatozoa nucleoproteins. *Microscopy Research and Techinique*, v. 61, p. 56-75. 2003.
4. FELICIANO SILVA, A. E. D.; DODE, M. A. N. & UNANIAN, M. M. . Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidades e fatores que influenciam. Campo Grande:Embrapa, CNPGC, 1993. 128 p.
5. OSTERMEIER, G. C.; SARGEANT, G. A.; YANDELL, B. S.; EVENSON, D. P. & PARRISH, J. J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *Journal of Andrology*, v. 22, n.4, p. 595-603. 2001.

41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

19 de Julho a 22 de Julho de 2004 - Campo Grande, MS

Tabela 1. Médias ajustadas para morfometria da cabeça espermática e variáveis seminais de acordo com a classificação do touro.

	Classificação	
	AP (n=4)	NAP (n=6)
Morfometria *	média ±epm	média ±epm
Área (µm ²)	35,8 ±0,37 ^a	31,0 ±0,11 ^a
Comprimento (µm)	9,3 ±0,02 ^a	8,7 ±0,01 ^a
Largura (µm)	5,0 ±0,01 ^a	4,6 ±0,01 ^a
Base (µm)	2,6 ±0,02 ^a	2,4 ±0,01 ^a
Variáveis seminais		
Motilidade (%)	77,0 ±0,21 ^a	69,4 ±0,94 ^a
Vigor (0-5)	3,9 ±0,02 ^a	3,6 ±0,05 ^a
Normais (%)	88,3 ±0,22 ^a	42,1 ±0,67 ^a
Defeitos (%)		
Cabeça	1,4 ±0,04 ^a	13,0 ±0,25 ^a
Acrossomo	0,6 ±0,06 ^a	14,3 ±0,40 ^a
Peça intermediária	1,2 ±0,04 ^a	5,9 ±0,19 ^a
Gota Citoplasmática Proximal	0,9 ±0,02 ^a	6,0 ±0,35 ^a
Cauda	10,7 ±0,14 ^a	11,1 ±0,44 ^a
Cabeça Destacada	0,3 ±0,04 ^a	3,9 ±0,16 ^a
Fragmentação Nuclear	1,8 ±0,19 ^a	23,0 ±0,39 ^a

AP=aptos; NAP=não aptos. Letras distintas entre colunas representam diferença significativa (p<0,01, Duncan); *com base nas medidas de 564 espermatozoides para AP e 745 para NAP.

Tabela 2. Correlação entre morfometria da cabeça espermática e variáveis seminais de acordo com a classificação do touro.

Variáveis	Classificação							
	AP (n=4)				NAP (n=6)			
	ÁREA	LARG	COMP	BASE	ÁREA	LARG	COMP	BASE
MOT	ns	ns	ns	ns	0,20	0,38	0,44	-0,49
VIG	ns	ns	-0,10	0,10	0,21	0,41	0,47	-0,53
NOR	ns	ns	-0,15	ns	ns	ns	ns	ns
CAB	-0,10	ns	-0,29	ns	0,20	0,23	0,22	-0,13
ACR	ns	ns	ns	ns	0,32	0,53	0,45	-0,46
PI	ns	ns	0,23	ns	ns	ns	ns	0,21
GCP	0,15	ns	0,21	0,13	-0,11	ns	0,10	-0,30
CAU	ns	ns	ns	ns	-0,44	-0,76	-0,66	0,70
CD	ns	ns	0,18	-0,18	ns	0,28	0,26	-0,45
FN	-0,15	ns	-0,33	ns	0,25	0,48	0,42	-0,48

ns=p>0,05; correlação (método de Pearson) com base em 564 células medidas nos touros aptos (AP) e 745 nos não aptos (NAP). LARG.=largura; COMP.=comprimento; MOT=motilidade, VIG=vigor; NOR=normais; CAB=defeitos de cabeça; ACR=defeitos de acrossomo; PI=defeitos de peça intermediária; GCP=gota citoplasmática proximal; CAU=defeitos de cauda; CD=cabeça destacada e FN=fragmentação nuclear.