Identificação e caracterização de subpopulações espermáticas em sêmen de jumentos

Autor(res)

Fábio Morotti
Fernando Eiras De Barros Pinto
Maria Fernanda Schmitt Pereira

Categoria do Trabalho

Pesquisa

Instituição

UNIVERSIDADE PITÁGORAS-UNOPAR ANHANGUERA

Introdução

A consideração de que o sêmen apresenta uma população uniforme e homogênea de células já é algo descreditado atualmente. A quantidade de variáveis espermáticas e a falta de informações sobre seu significado biológico, e por consequência sua importância prática, acabam por limitar o valor das informações obtidas. Portanto, novas abordagens visando aprimorar as informações obtidas na análise espermática tornaram-se necessárias (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009). Com isso, a realização de análises multivariadas passou a ser adotada, utilizando-se a Análise de Componentes Principais (PCA) e/ou métodos de agrupamento, como clustering de dados (K-means, Ward) para abordagens descritivas, as quais conseguiram fazer emergir alguns padrões celulares característicos em ejaculados analisados (MARTÍNEZ-PASTOR, 2022). As subpopulações espermáticas podem ser definidas com base na composição da membrana (BEER-LJUBI et al., 2012), ou ainda com base em parâmetros cinéticos (HIDALGO et al., 2021; NÚÑEZ MARTÍNEZ et al., 2006) e de morfometria (URBANO et al., 2017; ESTESO et al., 2006). A análise de subpopulações com base em dados morfométricos geralmente se concentra na cabeça do espermatozoide, diferenciando as células pelo tamanho da cabeça ou com base na elipticidade da mesma, mas há linhas de pesquisa relevantes que consideram também as dimensões da peça intermediária (PI) e da peça principal do flagelo (MARTÍNEZ-PASTOR, 2022). Conforme as técnicas de reprodução assistida (ART) se desenvolvem, tem-se buscado determinar quais são as melhores características espermáticas para a ART (MAROTO-MORALES et al., 2016). Com isso, torna-se possível selecionar machos que apresentem maior proporção de um tipo relevante de espermatozoides que possam favorecer a ART e deixar mais descendentes (MAROTO-MORALES et al., 2016).

Objetivo

O objetivo deste estudo é o de identificar as subpopulações espermáticas no sêmen de asininos de acordo com a morfometria espermática.

Material e Métodos

Três ejaculados de seis jumentos da raça foram colhidos utilizando-se uma vagina artificial. O sêmen foi filtrado para remoção da fração gel, e apenas ejaculados que apresentaram motilidade igual ou superior a 70%, foram

utilizados no processo. Uma alíquota de 10 µL foi diluída em 190 µL de água destilada aquecida a 37 °C (1:20), homogeneizada e distribuída em ambos os lados da câmara de Neubauer para a determinação da concentração espermática. Para a análise morfométrica, 3 L da amostra foram misturados ao corante eosina–nigrosina e feito o esfregaço em uma lâmina de vidro, sendo analisados 100 espermatozoides morfologicamente normais por grupo (Hidalgo et al., 2006). As mensurações foram realizadas utilizando uma câmera Olympus Q-Color3™ QImaging MP Q38071 (Olympus America Inc., USA) acoplada a um microscópio óptico de luz, sob aumento de 1000x, e analisadas com o software Olympus cellSens Standard 1.15® (Olympus America Inc., USA). Os seguintes parâmetros foram mensurados diretamente: comprimento da cabeça (HL), largura da cabeça (HW), comprimento da peça intermediária (MP), comprimento da cauda (TL) e área da cabeça (HA). A elipticidade da cabeça (ELLIP) foi calculada a partir de HL e HW (HL/HW). Os dados foram avaliados estatisticamente conforme descrito por Núñez Martínez, Morán e Peña (2006). Realizou-se uma Análise de Componentes Principais (PCA) dos dados, obtendo-se um pequeno número de componentes principais (PC) que retivessem o máximo possível de informação das variáveis originais. O segundo passo foi realizar uma análise não hierárquica utilizando o modelo K-means para identificar as diferentes subpopulações espermáticas. Os scores dos componentes principais respectivos a cada subpopulação foram testados quanto à sua normalidade. Utilizou-se o teste de Kruskal Wallis para comparar a significância ($p < 0,05$) entre as medianas de cada PC. Os dados foram analisados no software R Studio (2024), versão 4.3.3.

Resultados e Discussão

Após a realização de PCA, foram retidos três PCs, por explicaram pelo menos 70% da variância total dos dados e apresentarem autovalores superiores a 1 e foi trazida a proposição das seguintes combinações lineares:

PC1 = 0,301 x HL – 0,607 x HW – 0,073 x MP + 0,194 x TL + 0,029 x SH + 0,705 x Ellip

PC2 = 0,633 x HL + 0,367 x HW + 0,108 x MP + 0,039 x TL + 0,671 x SH + 0,018 x Ellip

PC3 = 0,086 x HL – 0,101 x HW + 0,722 x MP – 0,656 x TL – 0,107 x SH + 0,137 x Ellip

Os componentes principais PC1 e PC2, associaram-se respectivamente ao formato de cabeça dos espermatozoides, com altas cargas para largura da cabeça (HW) e elipicidade da cabeça (ELLIP) e ao tamanho da cabeça, com altas cargas para HL e HA. Por fim, PC3 associou-se a uma relação de grandeza inversa existente entre peça intermediária (MP) e comprimento da cauda (TL). Os resultados mostraram que no ejaculado fresco foram identificadas 4 subpopulações espermáticas. Destas, 27,94% corresponderam à subpopulação 1, caracterizada por células com formato de cabeça levemente arredondado (-0,292), um tamanho de cabeça elevado (1,034) e células com cauda comprida e peça intermediária curta (-0,575). Já, 27,10% corresponderam à subpopulação 2, a qual apresentou cabeças mais largas e arredondadas (-0,680) e de pequeno tamanho (-1,065), células com caudas longas e peças intermediárias curtas (-0,350). A subpopulação 3 (15,62%) caracterizou-se por células com formato de cabeça bastante arredondado (-0,712), tamanho modesto (0,383) e com caudas curtas e peças intermediárias longas (1,387). Por fim, a subpopulação 4 (29,34%) apresentou cabeças acentuadamente elípticas (1,475), tamanho relativamente pequeno (-0,209) e peça intermediária e cauda de tamanhos medianos (-0,006). A distribuição equilibrada entre as subpopulações no sêmen fresco denota uma grande heterogeneidade entre as subpopulações espermáticas, o que pode refletir a diversidade estrutural intrínseca dos ejaculados e sugerir que diferentes fenótipos morfológicos coexistem de forma relativamente estável no sêmen fresco (MARTÍNEZ-PASTOR, 2022). Os resultados também indicam que não há predominância de um único padrão morfométrico, mas sim um equilíbrio entre células com cabeças mais arredondadas ou elípticas, grandes ou pequenas, e com variações na relação entre cauda e peça intermediária (URBANO et al., 2017; ESTESO et al., 2006). Além disso, a clara distinção entre subpopulações evidencia a sensibilidade da análise multivariada em

captar variações sutis de forma e tamanho, que dificilmente seriam detectadas por análises univariadas tradicionais (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009).

Conclusão

O método estatístico em dois passos mostrou-se eficiente para reduzir a complexidade dos dados e identificar padrões morfométricos no ejaculado fresco de asininos. Com isso, puderam ser reconhecidas quatro subpopulações distintas e relativamente equilibradas, evidenciando a heterogeneidade estrutural do sêmen.

Referências

BEER-LJUBIC, B.; ALADROVIC, J.; MARENJAK, T.S.; MAJIC-BALIC, I.; LASKAJ, R.; MILINKOVIC-TUR, S. Biochemical properties of bull spermatozoa separated in iodixanol density solution. Research in Vetrinary Science, v. 92, n. 2, p. 292–294, 2012.

ESTESO, M. C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; SOLER, A. J.; MONTORO, A. J.; QUINTERO-MORENO, A.; GARDE, J. J. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of Iberian red deer (Cervus elaphus hispanicus) epididymal sperm heads. Reproduction in Domestic Animals, v. 41, p. 241–246, 2006.

HIDALGO, M.; RODRÍGUEZ, I.; DORADO, J. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. Theriogenology, v. 66, n. 4, p. 996-1003, 2006.

MAROTO-MORALES, A.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; RÁMON, M.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; SOLER, A. J.; GARDE, J. J. Current status and potential of morphometric sperm analysis. Asian Journal of Andrology, v. 18, p. 863-870, 2016.

MARTÍNEZ-PASTOR, F. What is the importance of sperm subpopulations? Animal Reproduction Science, v. 246, p. 1-10, 2022

NÚÑEZMARTÍNEZ, I.; MORAN, J. M.; PEÑA, F. J.; Two-Step Cluster Procedure After Principal Component Analysis Identifies Sperm Subpopulations in Canine Ejaculates and Its Relation to Cryoresistance. International Journal of Andrology, v. 27, n. 4, p. 596-603, 2006.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GARCIA, B. M.; RAMA, V. S. GALLARDO-BOLANOS, J. M.; GONZALEZ-FERNANDEZ, L.; TAPIA, J. A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; PEÑA, F. J. Identification of Sperm Subpopulations in Stallion Ejaculates: Changes after Cryopreservation and Comparison with Traditional Statistics. Reproduction in Domestic Animals, v. 44, n. 3, p. 419-423, 2009.

URBANO, M.; ORTIZ, I.; DORADO, J.; HIDALGO, M.; Identification of sperm morphometric subpopulations in cooled stored canine sperm and its relation with sperm DNA integrity. Reproduction in Domestic Animal, v.52, n. 3 p. 468-476, 2017.