

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA CABEÇA ESPERMÁTICA EM *Saimiri cassiquiarensis*

(Morphometric analysis of the sperm head in *Saimiri cassiquiarensis*)

Airton Renan Bastos SOARES^{1*}; Elaine Cristina Batista TORRES¹; Wlaysia Vasconcelos SAMPAIO¹; Danuza Leite LEÃO¹; Karol Guimarães OLIVEIRA³; Helder Lima QUEIROZ²; Sheyla Farhayldes Souza DOMINGUES¹

¹Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia, Universidade Federal do Pará, BR 316 KM 51, Cristo Redentor, Castanhal/PA; ²Instituto de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá/AM; ³Centro Nacional de Primatas/PA. *E-mail: airtonrsoares@gmail.com

ABSTRACT

The objective was to evaluate the sperm morphometry between normal and pathological cells in *Saimiri cassiquiarensis* aiming at the future use of data in CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Semen was collected from a male (*S. cassiquiarensis*) by electroejaculation. After collection, a smear in the proportion of 1:1 (semen and eosin-nigrosin stain) was performed, and 100 sperm were measured and morphologically classified as normal and pathological defects (major and minor). Of the total sperm analyzed, 48% were classified as normal and 52% pathological. Of the pathologies, the most frequent was a folded tail (40%), followed by a strongly folded tail (5%), curled tail (2%) and isolated head (5%). The morphometric data showed no statistical difference ($p < 0.05$) between normal and pathological defects. This is the first description for the sperm morphometry in *Saimiri cassiquiarensis*, therefore, from this database, future assessments at CASA can be conducted for this species.

Key-words: Sperm, CASA, squirrel monkey, biometry.

INTRODUÇÃO

A morfometria espermática é uma ferramenta prática para estudos filogenéticos (GARCIA *et al.*, 2003) e competição espermática (SAMPAIO *et al.*, 2017a), além dos dados servirem como parâmetros na avaliação da motilidade e morfologia espermática computadorizada, sendo essas apontadas por diversos autores como importante ferramenta na seleção de ejaculados (MATOS *et al.*, 2008).

O CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) tem como objetivo de visualizar, digitalizar e processar imagens com videomicrografia de alta definição (30 ou 60 Hz), com altos níveis de precisão e confiança. Entretanto, para o *software* analisar uma amostra, necessita-se a validação, fornecendo manualmente um banco de dados com o tamanho máximo e mínimo do diâmetro, área, perímetro, elipticidade, alongamento, regularidade e rugosidade da cabeça, somente assim o computador irá diferenciar um detrito do espermatozoide, dentro da faixa do tamanho de cabeça pré-estabelecida, e, aquelas partículas presentes na imagem com tamanho abaixo o acima deste limiar serão considerados parte do fundo e descartadas pelo *software* (MATOS *et al.*, 2008).

Muito tem se avançado no quesito fisiologia e biotecnologia reprodutiva no gênero de primatas neotropicais *Saimiri* (SAMPAIO *et al.*, 2017b). Contudo, ainda existem espécies pouco estudadas, como é o caso do *S. cassiquiarensis* em que foi explorado descrição inicial do sêmen, mas sem morfometria espermática (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A qualidade espermática em *Saimiri spp.* tem sido avaliada subjetivamente, usando estimativa visual de parâmetros de motilidade individual (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Contudo,

existe uma variação de 30 a 60 % na análise desses parâmetros, devido à limitação do olho humano em quantificar as subpopulações espermáticas (MATOS *et al.*, 2008). Portanto, torna-se importante a avaliação da morfometria espermática para auxiliar na dissimetria entre as espécies, selecionar ejaculados, classificar e diferenciar as células espermáticas do detrito seminal e/ou superposição de células para o uso no CASA. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi descrever a morfometria espermática em *Saimiri cassiquiarensis* avaliando a diferença entre espermatozoides normais e anormais, visando futuramente a utilização dos dados para a configuração da análise espermática computadorizada em indivíduos da mesma espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa e o Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Mamirauá de Desenvolvimento Sustentável (nº 002/2012), e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO / ICMBIO / MMA nº 299.006-1). Este estudo foi realizado com um macho de macaco-de-cheiro (*S. cassiquiarensis*) de vida livre, sexualmente maduro e saudável, capturado na Reserva Mamirauá de Desenvolvimento Sustentável. As amostras foram coletadas e processadas segundo Oliveira *et al.* (2015). Após a obtenção do sêmen por eletroejaculação, o animal foi encaminhado para os procedimentos de soltura. Enquanto o sêmen foi colocado em banho maria a 37 °C por 1,5 hora em diluente ACP-118® (água de coco em pó; 300mOsm kg⁻¹ e pH 7,8; ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará, Brasil), para a liquefação do coágulo. Após a liquefação, foi adicionado eosina-nigrosina (5µL Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) ao sêmen diluído (1:1), e realizado o esfregaço em uma lâmina pré-aquecida (37 °C).

Morfologia e Morfometria Espermática

Foram contados 100 espermatozoides e classificados quanto à morfologia como normais ou com alteração (na cabeça, peça ou cauda), com auxílio de microscópio (Leica DM LS 2, Leica Microsystems, Aargau, Suíça), na ampliação de x1000. Para a análise morfométrica, imagens dos espermatozoides foram capturadas com uma câmera Canon (R Power Shot S50) e processadas com o software Canon R Utilities Zoombrowser (EX 690 1996–2004, 5.0, Australia). As mensurações foram realizadas no software Image J R 1.46r (Wayne Rasband National Institutes of Health, IH, Bethesda, MD, EUA) conforme Sampaio *et al.*, (2017a). Foram mensurados: área (µm²), perímetro (µm), comprimento (µm) e largura (µm), elipticidade, alongamento, rugosidade e regularidade.

Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como médias±desvio padrão (DP) e analisados pelo Minitab software (Minitab Inc 2013, versão Minitab® 17.1.0). As variáveis foram checadas quanto a sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e para comparação foi utilizada ANOVA One Way quando os dados apresentaram uma distribuição normal e Wilcoxon

quando apresentaram distribuição anormal. As unidades estatísticas foram os espermatozoides (n=100), e o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme descrito na Tab. 01, 48% dos espermatozoides foram classificados como normais e 52% como patológicos (defeitos maiores e menores). Das patologias, a mais frequente foi cauda dobrada (40 %), seguida de cauda fortemente dobrada (5%), cauda enrolada (2%) e cabeça isolada (5%). Quando se considera a morfologia espermática, a porcentagem de patologias está de acordo com outras espécies do gênero (*S. collinsi* e *S. vanzolinii*) (SAMPAIO *et al.*, 2017a).

Tabela 01: Média (\pm DP) da morfometria espermática da cabeça espermática do sêmen *in natura* de *S. cassiquiarensis* (grupo normal e patológico) (n=1).

Parâmetros	Normal (n=48)	Patológico (n=52)
Comprimento	6,95 \pm 0,38 ^a	6,88 \pm 0,49 ^a
Largura	5,09 \pm 0,36 ^a	5,15 \pm 0,34 ^a
Área	27,85 \pm 2,92 ^a	27,873 \pm 3,27 ^a
Perímetro	20,00 \pm 0,95 ^a	19,95 \pm 1,23 ^a
Elipticidade	1,37 \pm 0,09 ^a	1,34 \pm 0,09 ^a
Alongamento	0,15 \pm 0,03 ^a	0,14 \pm 0,03 ^a
Regularidade	0,99 \pm 0 ^a	0,99 \pm 0 ^a
Rugosidade	0,87	

Para a morfometria, todos os parâmetros mensurados não apresentaram diferença estatística significativa entre células normais e patológicas, sugerindo que os defeitos não interferem na morfometria da cabeça espermática. Foi demonstrado que a cabeça espermática dos normais é aparentemente maior (Comprimento, largura, área e perímetro, respectivamente) em *S. cassiquiarensis* (6,95 \pm 0,38 - 5,09 \pm 0,36 - 27,85 \pm 2,92 - 20,00 \pm 0,95) do que descrito por Sampaio *et al.* (2017a) para *S. collinsi* (6,2 \pm 0,01 - 4,63 \pm 0,01 - 21,0 \pm 0,10 - 17,4 \pm 0,04) e *S. vanzolinii* (6,8 \pm 0,01 - 4,8 \pm 0,01 - 25,4 \pm 0,09 - 19,1 \pm 0,03), corroborando a utilização desse parâmetro para caracterizar as espécies e dar suporte a estudos filogeográficos e evolutivos (ALFARO *et al.*, 2015), taxonômicos, filogenéticos (STEINBERG *et al.*, 2009) e reprodutivos (SAMPAIO *et al.*, 2017a).

Estudos morfométricos, são necessários para caracterizar uma espécie e definir os padrões de qualidade seminal, auxiliando na seleção de machos em programas de reprodução. Dentre vários fatores que podem gerar uma variabilidade na estimativa dos parâmetros mensurados pelo CASA, está a identificação, configuração, validação e controle de qualidade da espécie, onde o sistema apresenta uma configuração única espécie-específica. Para o primeiro passo é fazer a identificação correta da espécie e da amostra, pois parâmetros morfométricos do esperma estabelecidos para a análise em *S. collinsi* (SAMPAIO *et al.*, 2017a), por exemplo, difere do sêmen de *S. cassiquiarensis*. Portanto, além de reforçar estudos evolutivos, caracterizar e diferir espécies, os dados servem como parâmetros básicos para a análises futuras em CASA do sêmen de *S. cassiquiarensis*.

CONCLUSÕES

No presente estudo, conclui-se que não há diferença estatística significativa na morfometria da cabeça entre espermatozoides normais e patológicos de *Saimiri cassiquiarensis*. Além de reforçar estudos evolutivos, caracterizar e diferir espécies, os dados obtidos servem como parâmetros básicos para pesquisas futuras em sistemas computadorizados de análise espermática no gênero *Saimiri*.

REFERÊNCIAS

- LYNCH ALFARO, J.W.L.; BOUBLI, J.P.; PAIM, F.P.; RIBAS, C.C.; SILVA, M.N.F.; MESSIAS, M.R.; ROHE, F.; MERCES, M.P.; SILVA JUNIOR, J.S.; SILVA, C.R.; PINHO, G.M.; KOSHKARIAN, G.; NGUYEN, M.T.; HARADA, M.L.; RABELO, R.M.; QUEIROZ, H.L.; ALFARO, M.E.; FARIAS, I.P. Biogeography of squirrel monkeys (genus *Saimiri*): South-central Amazon origin and rapid pan-Amazonian diversification of a lowland primate. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.82, p.436–54, 2015.
- GARCÍA, D.A.; MONTIEL, J.L.C.; PÉREZ, O.H.; PICHARDO, E.M.; REZA, F.A.C.; GARCÍA, R.A. Estudio comparativo de los testículos, epidídimos, glândulas sexuales accesorias y espermatozoides en tres especies de lagomorfos (*Romerolagus diazi*, *Lepus californicus* y *Oryctolagus cuniculus*). *Acta Zoológica Mexicana*, v.88, p.257–69, 2003.
- MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, n.4, p.225-232, 2008.
- OLIVEIRA, K.G.; SANTOS, R.R.; LEÃO, D.L.; QUEIROZ, H.L.; PAIM, F.P.; VIANEZ-JÚNIOR, J.L.S.G; DOMINGUES, S.F.S. Testicular biometry and semen characteristics in captive and wild squirrel monkey species (*Saimiri* sp.). *Theriogenology*, v.86, n.3, p.879–87, 2016.
- OLIVEIRA, K.G.; LEÃO, D.L.; SANTOS, R.R.; DOMINGUES, S.F.S. Seminal characteristics and cryopreservation of sperm from the squirrel monkey, *Saimiri collinsi*. *Theriogenology*, v.85, n.5, p.743-749, 2015.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.149-179, 2002.
- STEINBERG, E.R.; NIEVES, M.; ASCUNCE, M.S.; PALERMO, A.M.; MUDRY, M.D. Morphological and genetic characterization of *Saimiri boliviensis*. *International Journal of Primatology*, v.30, p.29–41, 2009.
- SAMPAIO, W.V.; OLIVEIRA, K.G.; LEÃO, D.L.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C.; QUEIROZ, H.L.; PAIM, F.P.; DOMINGUES, S.F.S. Morphologic analysis of sperm from two Neotropical primate species: Comparisons between the squirrel monkeys *Saimiri collinsi* and *Saimiri vanzolinii*. *Zygote*, v.25, n.1, p.141-148, 2017a.

SAMPAIO, W.V.; LEÃO, D.L.; SOUSA, P.C.; DOMINGUES, S.F.S. Contribuições da biotecnologia da reprodução sobre os desafios na manipulação do sêmen de primatas do gênero *Saimiri*. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.41, n.1, p.222-230, 2017b.