

ESTUDO PRELIMINAR DA MORFOMETRIA DA CABEÇA ESPERMÁTICA DO MACACO-DE-CHEIRO DE VIDA LIVRE

(Preliminary study of the spermatid head morphometry
of free living Ecuadorian Squirrel Monkey)

Elaine Cristina Batista TORRES^{1*}; Airton Renan Bastos SOARES¹; Wlaila Vasconcelos
SAMPAIO^{1,4}; Danuza Leite LEÃO^{1,2}; Karol Guimarães OLIVEIRA³; Helder
Lima de QUEIROZ²; Sheyla Farhayldes Souza DOMINGUES^{1,4}

¹Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia (UFPA). BR316, Km 61, Cristo,
Castanhal/PA, CEP: 68.740-970; ²Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá/AM;
³Centro Nacional de Primatas/PA; ⁴Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção
Animal na Amazônia (UFRA). *E-mail: torreselaine15@gmail.com

ABSTRACT

The objective of this study was to describe and compare the head morphometry of normal and pathological sperm from *Saimiri macrodon*. In the morphological analysis, 39% of the sperm had normal morphology, and 61% had major or minor defects, with pathology in the tails being the most frequent with 47% (38% curled tail, 7% folded tail and 2% strongly folded tail). Among the evaluated head morphometry parameters, area (A), width (L) and ellipticity (E) showed statistical difference ($p < 0.05$) between normal and pathological sperm. The average head area and width was lower in normal sperm ($p = 0,01$ e $p = 0,04$, respectively), and the mean ellipticity was higher ($p = 0,038$), when compared to pathological sperm. This definition of the sperm morphometric parameters of *S. macrodon* is important for the samples selection destined to reproduction biotechnologies and for the clarification of taxonomic and evolutionary issues in the genus *Saimiri*.

Key words: Biometrics, biotechnology, semen, neotropical primates.

INTRODUÇÃO

Em programas de reprodução, a avaliação dos parâmetros morfométricos têm relevância fundamental na determinação e distribuição de espermatozoides viáveis, que podem definir o grau de fertilidade, *in vitro* e *in vivo*, de acordo com as alterações encontradas nas células espermáticas (ARAGÃO, 2011). Estudos evidenciam que a variação da morfometria espermática pode ser um indicador da estrutura anormal da cromatina, em cães foi observada uma relação entre as variações morfométricas da cabeça espermática e a quantidade de DNA desnaturado no ejaculado (NÚÑEZ-MARTINEZ *et al.*, 2007). A velocidade de natação do espermatozoide também pode ser afetada pelo tamanho da cabeça espermática, o qual pode retardar o impulso propulsor da cauda, levando a uma diminuição da motilidade (TOURMENTE *et al.*, 2011).

Nesse sentido, algumas espécies do gênero *Saimiri* (macacos-de-cheiro) já possuem a descrição da morfometria espermática, como *S. boliviensis*, *S. sciureus* (STEINBERG *et al.*, 2019), *S. collinsi* e *S. vanzolinii* (SAMPAIO *et al.*, 2017). No entanto, não há descrições na literatura da morfometria espermática de *Saimiri macrodon*, demonstrando a necessidade da ampliação desses estudos. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi descrever a morfometria da cabeça espermática de *S. macrodon*, e comparar a morfometria com a morfologia de espermatozoides normais e anormais, visando a formação de um banco de dados,

que poderá ser utilizado com uma ferramenta para análise espermática para espécies do gênero *Saimiri*.

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 de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (nº 002/2012) e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO/ICMBIO/MMA nº.299.006-1). Todos os procedimentos foram supervisionados por um Médico Veterinário. Este estudo foi realizado com *Saimiri macrodon* de vida livre, capturado na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá conforme descrito por Oliveira *et al.* (2016).

As amostras foram coletadas e processadas segundo Oliveira *et al.*, (2016). A coleta seminal foi realizada no local de captura para evitar a remoção do animal do seu lugar de origem, após a recuperação anestésica o animal foi liberado no mesmo local. Imediatamente, após a ejaculação, o sêmen foi incubado em banho maria a 37 °C por 1,5 hora com o diluidor ACP-118[®] (água de coco em pó; 300mOsm kg⁻¹, ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará, Brasil) para a liquefação do coágulo. Para a avaliação da morfometria e da morfologia, foram confeccionados esfregaços do sêmen (5µL) corados com eosina-nigrosina (5µL) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Foram contadas 100 células, e em seguida foram classificadas quanto a morfologia como normais, com defeitos maiores ou menores, conforme o recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), e avaliadas quanto à morfometria. As análises foram realizadas com um microscópio (Leica DMLS 2, Leica Microsystems, Suíça) em uma ampliação de 1000×. Todas as imagens foram capturadas com uma Canon R Power Shot S50 e processado no software Canon R Utilities Zoom Browser (EX 690 1996–2004, 5.0, Austrália). As mensurações foram feitas com o software Image J R 1.46r (Wayne Rasband National Institutes of Health, IH, Bethesda, MD, EUA). Foram mensurados: área (µm²), perímetro (µm), comprimento (µm) e largura (µm), elipticidade e alongamento da cabeça espermática expressos em pixels e transformados em micrômetros (YÁNIZ *et al.*, 2015).

Na análise estatística, todos os dados foram expressos como média±desvio padrão (DP) e analisados pelo Minitab *software* (Minitab Inc 2013, versão Minitab[®] 17.1.0). As variáveis foram avaliadas quando sua normalidade pelo *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

Foi obtido 500µL de sêmen, na classificação morfológica 39% dos espermatozoides foram normais, 19% apresentaram defeitos maiores e 42% defeitos menores. Dentre essas patologias, 47% foram defeitos de cauda (38% cauda enrolada na porção terminal, 7% cauda dobrada e 2% cauda fortemente dobrada), 14% de peça intermediária curvada e 1% de gota proximal. A área da cabeça e largura foram maiores nos espermatozoides patológicos (p=0,01

e $p=0,04$, respectivamente), quando comparado aos espermatozoides normais. Já a elipticidade, apresentou uma média menor para espermatozoides defeituosos, em relação aos normais ($p=0,038$) (Tab. 01). Demonstrando que aqueles gametas considerados anormais pela classificação prévia (CBRA, 2013) apresentam uma alteração significativa na sua morfometria. Este pode ser um indicativo de um menor grau de condensação da cromatina, como já observado em outras espécies (GAGGINI *et al.*, 2017) que pode ocasionar a uma redução no potencial de fertilização, como demonstrado em humanos (GARRETT *et al.*, 1997). Esses parâmetros morfométricos podem auxiliar na seleção de amostras com maior percentual de espermatozoides morfometricamente normais e de melhor qualidade para desenvolvimento e aplicação de biotécnicas da reprodução (MAROTO-MORALES *et al.*, 2016).

Tabela 01: Morfometria de espermatozoides (n=100) de *Saimiri macrodon* adulto.

PARÂMETROS (μm)	NORMAIS	DEFEITUOSOS
Área (A)	26.27 \pm 3.02 ^b	27.59 \pm 3.43 ^a
Perímetro (P)	19.56 \pm 1.10	20.02 \pm 1.16
Comprimento (C)	6.79 \pm 0.46	6.90 \pm 0.43
Largura (L)	4.91 \pm 0.33 ^b	5.07 \pm 0.40 ^a
Elipticidade (C/L)	1.38 \pm 0.10 ^a	1.36 \pm 0.09 ^b
Alongamento (C-L)/(C+L)	0.16 \pm 0.03	0.15 \pm 0.03

^{a b} Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística quando $P < 0,05$.

Outro fator importante, é que a liquefação do coágulo seminal, foi realizada com ACP-118®, um diluidor desenvolvido para o sêmen de *Sapajus apella* por Oliveira *et al.* (2011), pode não ser um meio isosmótico para o sêmen de *S. macrodon*, e causar estresse osmótico. Visto que, em resposta ao estresse osmótico ocorre a remodelação do citoesqueleto de actina nos espermatozoides, levando a alteração no volume celular e ao aparecimento de defeitos na cauda dos espermatozoides (CORREA *et al.*, 2007).

CONCLUSÕES

Este estudo contribui com mais informações acerca da biologia reprodutiva de uma das espécies do gênero *Saimiri*, e colabora na discussão de questões taxonômicas e sistemáticas. Além disso, estes resultados também podem ser incorporados nas configurações de *softwares* que realizam a análise computadorizada com sêmen, visto que esta é a primeira vez descrita as dimensões morfométricas da cabeça de *S. macrodon*.

REFERÊNCIAS

ARAGÃO, C.P.M. Morfometria da cabeça de espermatozoide de caprinos diluídos e criopreservados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c). 2011. 73p. (Dissertação

de Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza/CE, 2011.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal, 3ª ed., Belo Horizonte: CBRA. p.85-90, 2013.

CORREA, L.M.; THOMAS, A.; MEYERS, S.A. The macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to morphological defects and decreased motility. *Biology of Reproduction*, v.77, n.6, p.942–953, 2007.

GAGGINI, T.S.; ROCHA, L.O.; SOUZA, E.T.; REZENDE, F.M.; ANTUNES, R.C.; BELETTI, M.E. Head morphometry and chromatin instability in normal boar spermatozoa and in spermatozoa with cytoplasmic droplets. *Animal Reproduction*, v.14, supl.1, p.1253–1258, 2017.

GARRETT, C.; LIU, D.Y.; BAKER, H.W. Gordo. Selectivity of the human sperm-zona pellucida binding process to sperm head morphometry. *Fertility and Sterility*, v.67, n.2, p.362–371, 1997.

MAROTO-MORALES, A.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; RAMÓN, M.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; SOLER, A.; GARDE, J. Current status and potential of morphometric sperm analysis. *Asian Journal of Andrology*, v.18, n.6, p.863–870, 2016.

NÚÑEZ-MARTINEZ, I.; MORAN, J.M.; PEÑA, F.J. Identification of sperm morphometric subpopulations in the canine ejaculate: do they reflect different subpopulations in sperm chromatin integrity? *Zygote*, v.15, n.3, p.257-266, 2007.

OLIVEIRA, K.G.; MIRANDA, S.A.; LEÃO, D.L.; BRITO, A.B; SANTOS, R.R; DOMINGUES, S.F.S. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. *Animal Reproduction Science*, v.123, n.1-2, p.75–80, 2011.

OLIVEIRA, K.G.; SANTOS, R.R.; LEÃO, D.L.; BRITO, A.B; LIMA, J.S.; SAMPAIO, W.V; DOMINGUES, S.F. Cooling and freezing of sperm from captive, free-living and endangered squirrel monkey species. *Cryobiology*, v.72, n.3, p.283-289, 2016.

STEINBERG, E.R.; SESTELO, A.J.; CEBALLOS, M.B.; WAGNER, V.; PALERMO, A.M.; MUDRY, M.D. Sperm morphology in neotropical primates. *Animals*, v.9, n.10, p.1–15, 2019.

SAMPAIO, W.V.; OLIVEIRA, K.G.; LEÃO, D.L.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C.; QUEIROZ, H.L.; PAIM, F.P.; SANTOS, R.R.; 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.2, p.141–148, 2017.

TOURMENTE, M.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E.R.S. Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evolutionary Biology*, v.11, n.1, p.12, 2011.

YÁNIZ, J.L.; SOLER, C.; SANTOLARIA, P. Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Animal Reproduction Science*, v.156, p.1–12, 2015. doi: 10.1016 / j.anireprosci.2015.03.002