

Tamanho amostral na identificação de subpopulações espermáticas em carneiros Santa Inês

Jonatan Mikhail Del Solar Velarde¹, Fabiana Almeida Bidegain², Rebeca Santos da Silva³, Alexandre Nizio Maria⁴, Hymerson Costa Azevedo⁵

Resumo

A cinética espermática é importante por estar correlacionada positivamente com a fertilidade do sêmen. Estudos de cinética utilizam ferramentas estatísticas multivariadas para incrementar a acurácia na identificação de subpopulações espermáticas em ovinos; assim o tamanho amostral é importante na variabilidade do agrupamento de células. Objetivou-se estudar a influência do n amostral aleatório na identificação de subpopulações espermáticas. Foi utilizado o banco de informações digitais da análise seminal feita em 35 carneiros adultos no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal – Embrapa Tabuleiros Costeiros; constituindo um total de 77070 observações espermáticas contendo dados de velocidades curvilínea (VCL), em linha reta (VSL) e do percurso médio (VAP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), índice de oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH) e batimento flagelar Cruzado (BCF) dos espermatozoides. Foi utilizada a metodologia estatística de análise dos componentes principais sendo testados diferentes n amostrais: 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 5000 e 15000. A influência do n amostral na identificação de subpopulações espermáticas em carneiros Santa Inês, considerando cinco parâmetros cinéticos espermáticos foi significativa ($p < 0,05$), onde o n amostral abaixo de 50 espermatozoides avaliados mostrou uma maior variabilidade

¹ Zootecnista, doutorando em Zootecnia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA.

² Médica-veterinária, mestre em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

³ Médica-veterinária, mestre em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

⁴ Zootecnista, doutor em Produção Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁵ Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

numérica comparada aos outros tamanhos amostrais. Conclui-se que para identificar subpopulações espermáticas homogêneas, pode ser simulado o n amostral igual ou maior de 50 espermatozoides selecionados aleatoriamente e com pelo menos 10 repetições.

Palavras-chave: cinética, espermatozoides, motilidade, sêmen, velocidade.

Introdução

O tamanho amostral é importante para identificar subpopulações espermáticas. Um processo estatístico importante é a amostragem (PATTEN, 2004) que depende de cinco componentes essenciais para ser robusta e para obterem-se resultados confiáveis: 1) desenho experimental aplicado; 2) modelo do cenário; 3) efeitos e variabilidade das características a serem amostradas; 4) método estatístico a ser utilizado e; 5) objetivo do estudo (CASTELLOE; O'BRIEN, 2011). Assim, existem diversas ferramentas estatísticas para estimar o n amostral e sua magnitude aplicada na estatística univariada (KADAM; BHALERAO, 2010) ou para a estatística multivariada (BEN-HUR; GUYON. 2003).

O estudo da cinética espermática é importante por ter correlação positiva com a fertilidade seminal (ROBAYO et al., 2008). Em estudos realizados com sêmen de ovinos, têm sido utilizadas ferramentas estatísticas multivariadas na identificação de subpopulações espermáticas (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2014; RAMÓN et al., 2013). Agrupamentos hierárquicos (QUINTERO-MORENO et al., 2003, MARTINEZ-PASTOR et al., 2005); análise de componentes principais (DORADO et al., 2010; NUÑEZ et al., 2006) e agrupamentos em duas etapas (MARTÍNEZ et al., 2006; BEIRÃO et al., 2011) são estratégias estatísticas que permitem a identificação de subpopulações espermáticas, que utilizam vários critérios. Visando aperfeiçoar os procedimentos estatísticos multivariados, o objetivo deste trabalho foi verificar se o tamanho amostral tem influência sobre a identificação do número de subpopulações espermáticas no sêmen de carneiros Santa Inês.

Material e Métodos

Banco de dados

Foi utilizado o banco de informações digitais de análise da cinética espermática de amostras de sêmen de 35 carneiros reprodutivamente ativos, de fertilidade comprovada e de diferentes grupos de contemporâneos ($5 \pm 2,3$ anos de idade) que foram analisadas no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Embrapa Tabuleiros Costeiros, constituindo um total de 77070 observações registradas pelo sistema computacional de análise seminal (CASA) (Sperm Class Analyzer, SCA2002, Microptic S.L.: Barcelona, Espanha), contendo dados de velocidades curvilínea (VCL), em linha reta (VSL) e do percurso médio (VAP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), índice de oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH) e batimento flagelar Cruzado (BCF) dos espermatozoides.

Desenho Experimental

Cada n amostral estudado foi composto por uma amostra aleatória obtida do universo de 77070 observações. A amostragem aleatória para o $n = 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 5000$ e 15000 teve dez repetições por n amostral.

Simulações e Análise Estatística

A análise de componentes principais (PEARSON, 1901) foi realizada utilizando-se o pacote FactoMineR (HUSSON et al., 2015) do software R (DEVELOPMENT CORE R, 2014) para a identificação de subpopulações espermáticas colocando como critérios de agrupamento os parâmetros cinéticos dos espermatozoides. Para comparar o número de subpopulações obtidas em cada n amostral, foi utilizado o modelo linear geral misto onde o n amostral foi considerado o efeito fixo e as repetições o efeito aleatório e; o Teste de Tukey (0,05) para comparação múltipla de médias. Para estimar a influência da variância oferecida pelo n amostral, foi realizada uma regressão linear simples do Erro Padrão Amostral em função do n amostral. Os procedimentos estatísticos PROC GLMMIX e PROC REG do software SAS 9.1 (SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, North Carolina, US) foram aplicados para executar o modelo linear geral misto e a regressão linear simples, respectivamente.

Resultados e Discussão

Foi observada influência significativa ($p < 0,05$) do n amostral na identificação de subpopulações espermáticas, considerando os parâmetros cinéticos dos espermatozoides; onde unicamente o valor mais baixo ($n = 10$) mostrou uma maior variabilidade comparada com o resto dos n amostrais (Tabela 1).

Tabela 1. Influência do n amostral sobre o número de subpopulações espermáticas ($r^2 = 0,7809$; $CV = 0,1809$). O número de subpopulações é apresentado em forma de Média \pm Erro Padrão.

Tamanho Amostral	Número de Subpopulações (p-valor)
10	8 \pm 0,4 (b)
50	3 \pm 0,2 (a)
100	3 \pm 0,2 (a)
250	3 \pm 0,3 (a)
500	3 \pm 0,2 (a)
750	3 \pm 0,3 (a)
1000	3 \pm 0,3 (a)
1500	3 \pm 0,1 (a)
2000	3 \pm 0,3 (a)
3000	3 \pm 0,2 (a)
5000	3 \pm 0,3 (a)
15000	3 \pm 0,1 (a)

$p < 0,05$ foi considerado para admitir significância estatística com o Test de Tukey.

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa.

A alta quantidade de subpopulações espermáticas identificadas no n amostral 10 indica que as simulações apresentaram uma variação elevada e não poderia ser utilizada como ferramenta na identificação de agrupamentos espermáticos no sêmen de carneiros Santa Inês.

Essa variância é encarregada de informar a eficiência do n amostral sob estudo. Cada um dos parâmetros estatísticos utilizados em avaliação experimental tem sua própria importância; tais como o objetivo de estudo, o desenho experimental, o método da análise de dados e a variabilidade populacional

que formam parte de um complexo estatístico desenhado para trabalhar em conjunto (CASTELLOE, 2004).

A variabilidade depende muito do n amostral e vice-versa e, mensurada mediante o erro-padrão, atua como indicador de proporção da variância de subpopulações identificadas. Biau (2011) descreve o erro-padrão como uma medida estatística com fins inferenciais, para estimar a variância total de uma ou várias características dentro de uma população; sendo que quando o n amostral se incrementa, essa variabilidade cai (BRAIN; WEBB, 1999).

Contudo, para as simulações estudadas foi verificado que a variância de subpopulações identificadas tende a diminuir quando o n amostral incrementa (Figura 1), enquanto que o poder para identificar novas e diferentes subpopulações espermáticas é menor.

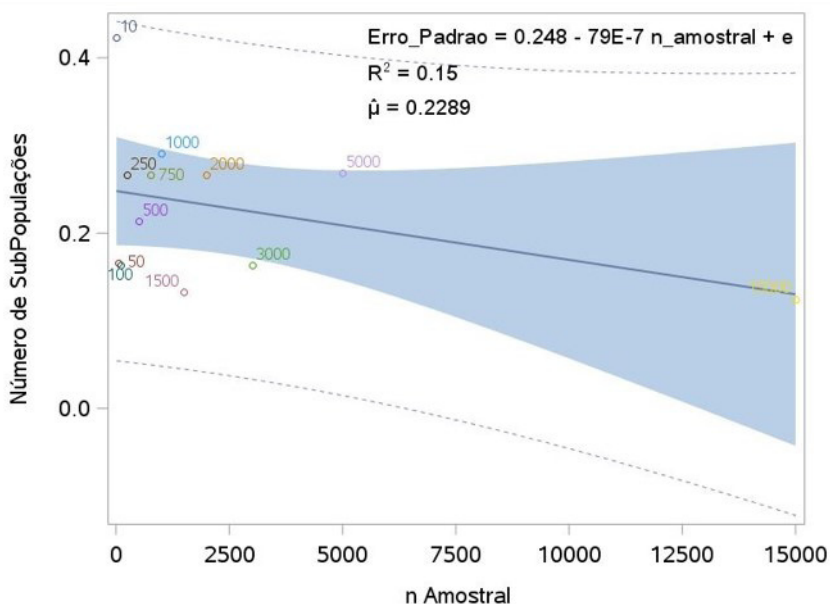


Figura 1. Dispersão do Erro Padrão em função do aumento do n amostral, com o ajuste da regressão linear (linha azul).

Conclusões

A identificação de subpopulações espermáticas em ovinos Santa Inês, utilizando a metodologia estatística de análise dos componentes principais, é influenciada pelo n amostral. Para identificar subpopulações espermáticas homogêneas, pode ser simulado o n amostral igual ou maior de 50 espermatozoides selecionados aleatoriamente e com pelo menos dez repetições.

Agradecimentos

À Capes pela concessão da bolsa de Doutorado.

Referências

BEIRÃO, J.; E. CABRITA, S. PÉREZ-CEREZALES, S. MARTÍNEZ-PÁRAMO, M. P. HERRÁEZ. Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. *Cryobiology*, v. 62, n. 1, p. 22-31, 2011.

BEN-HUR AND I. GUYON. Detecting stable clusters using principal component analysis. BROWNSTEIN, M. J.; KOHODURSKY, A. (Ed.) In: **Functional genomics: methods and protocols**. Humana press, 2003. p. 159-182.

BRAIN, D., WEBB, G. On the effect of data set size on bias and variance in classification learning. In: RICHARDS, D.; G. BEYDOUN, HOFFMANN, A.; COMPTON, P. (Ed.). In: AUSTRALIAN KNOWLEDGE ACQUISITION WORKSHOP, 4., 1999. **Proceedings...** 1999. p. 117-128.

CASTELLOE, J. M. Sample Size Computations and Power Analysis with the SAS System. In: ANNUAL SAS USERS GROUP INTERNATIONAL CONFERENCE, 25., 2000, Cary. **Proceedings...** Cary, NC: SAS Institute Inc., 2000. p. 25-65.

CASTELLOE, JOHN M.; O'BRIEN, RALPH G. Power and sample size determination for linear models. In: SIXTH ANNUAL SAS USERS GROUP INTERNATIONAL CONFERENCE, 26., 2001. **Proceedings...** 2001. p. 240-26.

DORADO, J.; MOLINA, I.; MUÑOZ-SERRANO, A.; HIDALGO, M. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. **Theriogenology**, v. 74, 2010. Issue 5.

FRANCOIS, H.; JULIE, J.; SEBASTIEN, L.; JEREMY, M. **FactoMineR**: multivariate exploratory data analysis and data mining. 2015. R package version 1.30. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR>>. Acesso em: 01 jul. 2015.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; DEL OLMO, E.; JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; ROCIO, A.; LUIS, G.; JULIÁN, J.; SOLER, A. J. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support in vitro capacitation and fertilisation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, p. 725-732, 2014.

QUINTERO-MORENO, A ; J MIRÓ, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates, **Theriogenology**, v. 59, p. 1973-1990, may. 2003. Issue 9

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; HERRAEZ, P.; ANEL, L.; DE PAZ, P. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 2, p. 316-327, 2005.

MARTÍNEZ, I. N.; MORÁN, J. M.; PEÑA, F. J. Two-Step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 596-603, 2006.

NUÑEZ-MARTINEZ, I.; MORAN, J.; PENA, F. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 408-415, 2006.

PEARSON, K. "On lines and planes of closest fit to systems of points in space" (PDF). **Philosophical Magazine**, v. 2, n. 11, p. 559-572, 1901.

PRASHANT, K.; SUPRIYA, B. Sample size calculation. **International Journal of Ayurveda Research**, v. 1, n.1, p. 55-57, 2010.

RAMÓN, M; PÉREZ-GUZMÁN, M. D.; JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; ESTESO, M. C.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A. Sperm cell population dynamics in ram semen during the cryopreservation process. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.

ROBAYO, I.; MONTENEGRO, V.; VALDÉS, C.; COX, J. C. Assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 393-399, 2008.

SULLIVAN, G. M.; RICHARD, F. Using effect size or why the p value is not enough. **Journal of Graduate Medical Education**, v. 4, n. 3, p. 279-282, 2012.