



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**



**ANÁLISE DAS SUBPOPULAÇÕES DE
ESPERMATOZOIDES MÓVEIS DE CARNEIROS
SELECIONADOS POR CRITÉRIOS ETÁRIOS E
ANDROLÓGICOS E SUBMETIDOS A MÉTODOS DE
CONSERVAÇÃO SEMINAL**

DAVI ANDRADE OLIVEIRA

Mestrado

2019

PROZOOTEC – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**



DAVI ANDRADE OLIVEIRA

**ANÁLISE DAS SUBPOPULAÇÕES DE
ESPERMATOZOIDES MÓVEIS DE CARNEIROS
SELECIONADOS POR CRITÉRIOS ETÁRIOS E
ANDROLÓGICOS E SUBMETIDOS A MÉTODOS DE
CONSERVAÇÃO SEMINAL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Sergipe
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Zootecnia.

Orientador:

Dr. Hymerson Costa Azevedo

**SÃO CRISTOVÃO-SE
2019**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Oliveira, Davi Andrade
O48a Análise das subpopulações de espermatozoides móveis de carneiros selecionados por critérios etários e andrológicos e submetidos a métodos de conservação seminal / Davi Andrade Oliveira ; orientador Hymerson Costa Azevedo. – São Cristóvão, SE, 2019.
42 f. : il.

Dissertação (mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Zootecnia. 2. Ovino - Carneiros. 3. Inseminação artificial. I. Azevedo, Hymerson Costa, orient. II. Título.

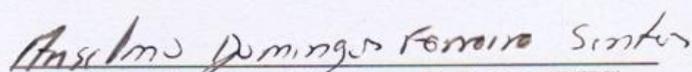
CDU 636.32/.38.082

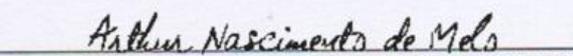
DAVI ANDRADE OLIVEIRA

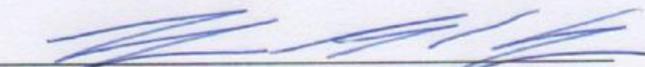
**ANÁLISE DAS SUBPOPULAÇÕES DE
ESPERMATOZOIDES MÓVEIS DE CARNEIROS
SELECIONADOS POR CRITÉRIOS ETÁRIOS E
ANDROLÓGICOS E SUBMETIDOS A MÉTODOS DE
CONSERVAÇÃO SEMINAL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Sergipe
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Zootecnia.

APROVADA em 31 de julho de 2019.


Prof. Dr. Anselmo Dómingos F. Santos (UFS)


Prof. Dr. Arthur Nascimento de Melo (UFS)


Dr. Hymerson Costa Azevedo (EMBRAPA)

**SÃO CRISTOVÃO-SE
2019**

Aos meus pais, irmãos, avós e amigos.
Dedico

“O melhor dia para plantar uma árvore foi há 20 anos. O segundo melhor é hoje.”

Proverbio Chinês

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e presença em todos os momentos.

Aos meus avós, pais e irmãos ao apoio em minha vida.

Ao meu orientador Dr. Hymerson Costa Azevedo pelos ensinamentos que fizeram diferença em meu crescimento.

Aos amigos e equipe do LABRA: Maiana Chaves, Clêrton Pereira, Jerí Molina, Islan Dias, Michele Silva e Mateus Oliveira pela colaboração e risadas.

Ao Dr. Alexandre Nizio pela colaboração e contribuição nesse trabalho.

Aos professores Anselmo Santos e Arthur Nascimento pelas contribuições como membros da banca.

A toda equipe do Campo Experimental Pedro Arle pela colaboração, dedicação e disposição.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros pela disponibilização de toda a estrutura e animais necessários para a realização do experimento.

À Universidade Federal de Sergipe pelo incentivo à qualificação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PROZOOTEC) pela oferta e oportunidade do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio na realização desse trabalho.

A todos que estiveram presentes nos momentos de alegrias e dificuldades.

OBRIGADO!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO GERAL	iv
ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	3
CAPÍTULO: ALTERAÇÕES NAS SUBPOPULAÇÕES DE ESPERMATOZOIDES MÓVEIS DE CARNEIROS SUBMETIDOS A CRITÉRIOS DE SELEÇÃO E MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO SEMINAL.	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. Introdução.....	9
2. Material e Métodos.....	10
3. Resultados.....	14
4. Discussão.....	16
5. Conclusão	21
6. Agradecimentos.....	21
7. Referências	22
ANEXOS	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de espermatozoides móveis no sêmen fresco de carneiros Santa Inês submetidos a critérios de seleção etária e andrológica e a diferentes métodos de conservação seminal. Valores expressos em média \pm desvio padrão.....	27
Tabela 2. Caracterização das subpopulações de espermatozoides móveis obtidas pela análise cinética espermática computadorizada (CASA) do sêmen de carneiros Santa Inês submetidos a critérios de seleção etária e andrológica e a diferentes métodos de conservação seminal. Valores expressos em média \pm desvio padrão.	28
Tabela 3. Proporção de subpopulações (cluster) de espermatozoides móveis no sêmen de carneiros Santa Inês submetidos a critérios de seleção etária e andrológica e a diferentes métodos de conservação seminal.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição das subpopulações de espermatozoides móveis obtidas pela análise cinética espermática computadorizada (CASA) no sêmen fresco de carneiros sem seleção (SF-T), selecionados por critérios andrológicos (SF-S), de jovens (SF-S \leq 18) e adultos (SF-S $>$ 18) selecionados por critérios andrológicos, e no sêmen refrigerado (SR) e congelado (SC).....30

LISTA DE ABREVIATURAS

ALH – Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça
BCF – Frequência do Batimento Flagelar Cruzado
CASA – *Computer Assisted Sperm Analysis*
CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
DP – Desvio Padrão
FIV – Fertilização *in vitro*
GGL – Meio diluidor à base de gema, glicina e leite
IA – Inseminação Artificial
LABRA – Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal
LIN – Linearidade
N₂L – Nitrogênio Líquido
SAS – *Statistical Analysis System*
SC – Sêmen congelado
SCA – *Sperm Class Analyzer*
SF – Sêmen fresco
SF-S – Sêmen fresco de carneiros selecionados
SF-S>18 – Sêmen fresco de carneiros selecionados não contemporâneos e adultos
SF-S≤18 – Sêmen fresco de carneiros selecionados contemporâneos e jovens
SF-T – Sêmen fresco sem seleção
SPTZ – Espermatozoide
SR – Sêmen refrigerado
STR – Retilinearidade
VAP – Velocidade do Percurso Médio
VCL – Velocidade Curvilínea
VSL – Velocidade em Linha Reta
WOB – Índice de Oscilação

RESUMO GERAL

OLIVEIRA, Davi Andrade. **Análise das subpopulações de espermatozoides móveis de carneiros selecionados por critérios etários e andrológicos e submetidos a métodos de conservação seminal.** Sergipe: UFS, 2019. 42p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia).

A análise das subpopulações espermáticas baseada na cinética é uma importante ferramenta de seleção de carneiros para acasalamento e de amostras seminais submetidas à conservação. O objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio da análise em sistema computadorizado (CASA), a influência da seleção de carneiros Santa Inês por critérios etários e andrológicos e dos métodos de conservação seminal sobre o número, caracterização e distribuição das subpopulações espermáticas. Foi avaliada a cinética de 337.606 espermatozoides distribuídos nos grupos: sêmen fresco de carneiros sem nenhuma seleção (SF-T); sêmen fresco de carneiros selecionados por exame andrológico (SF-S); sêmen fresco de carneiros jovens (SF-S \leq 18) e adultos (SF-S $>$ 18) selecionados por exame andrológico; sêmen refrigerado (SR) e congelado (SC) de carneiros selecionados por exame andrológico. Espermatozoides com VCL <100 , ≥ 100 e <200 e ≥ 200 $\mu\text{m/s}$ foram considerados como lentos, médios e rápidos, respectivamente, e aqueles com LIN $\geq 40\%$ e STR $\geq 70\%$ como lineares e progressivos. Os dados de cinética gerados foram relativizados e avaliados pelo método de agrupamento *Two-Step Cluster*. As médias de cada parâmetro foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis para testar as diferenças entre as subpopulações espermáticas (clusters) dos grupos experimentais. Os grupos SF-T e SR-S apresentaram três subpopulações cada; o grupo SF-S $>$ 18 foi o mais heterogêneo com quatro; já os grupos SF-S \leq 18, SR e SC apresentaram apenas duas subpopulações. Entre os clusters dos grupos de carneiros selecionados (SF-S, SF-S \leq 18, SF-S $>$ 18), o cluster 1 do SF-S $>$ 18 apresentou os maiores valores ($P < 0,05$) para a maioria dos parâmetros cinéticos (VSL, VAP, LIN, STR, BCF e WOB), enquanto o cluster 2 do grupo SF-S \leq 18 os menores ($P < 0,05$). O cluster 1 do grupo SC apresentou os maiores valores médios para VSL, VAP, LIN, STR, BCF e WOB em relação aos grupos SF-S e SR ($P < 0,05$). Conclui-se que o número, características e proporção das subpopulações de espermatozoides móveis são influenciadas pela seleção de carneiros por critérios etários e andrológicos e pelos métodos de conservação seminal. As subpopulações são mais heterogêneas no sêmen fresco de carneiros adultos em relação aos jovens submetidos à seleção, e mais homogêneas em amostras seminais refrigeradas e congeladas.

Palavras-chave: Ovinos, cinética espermática, CASA, andrológico, refrigeração do sêmen, congelação do sêmen.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Davi Andrade. Analysis of sperm motility subpopulations of ram selected by age and andrological criteria and submitted to seminal conservation methods. Sergipe: UFS, 2019. 42p. (Dissertation – Master in Zootecnia).

The analysis of sperm subpopulations based on kinetics is an important tool for selecting ram for mating and seminal samples subjected to conservation. The aim of the present study was to evaluate, through computerized system analysis (CASA), the influence of Santa Inês ram selection by age and andrological criteria and seminal conservation methods on the number, characterization and distribution of sperm subpopulations. The kinetics of 337,606 sperm distributed in the groups were evaluated: fresh semen from ram without any selection (SF-T); fresh semen from ram selected by andrological examination (SF-S); fresh semen from young ram (SF-S \leq 18) and adults (SF-S $>$ 18) selected by andrological examination; refrigerated (SR) and frozen (SC) semen from ram selected by andrological examination. Spermatozoa with VCL <100 , ≥ 100 and <200 and ≥ 200 $\mu\text{m} / \text{s}$ were considered as slow, medium and fast, respectively and those with LIN $\geq 40\%$ and STR $\geq 70\%$ as linear and progressive. The kinetics data generated were relativized and evaluated by the Two-Step Cluster clustering method. The means of each parameter were compared using the Kruskal-Wallis test to test the differences between the sperm subpopulations (clusters) of the experimental groups. The SF-T and SR-S groups had three subpopulations each; the SF-S $>$ 18 group was the most heterogeneous with four; the SF-S \leq 18, SR and SC groups had only two subpopulations. Among the clusters of the selected ram groups (SF-S, SF-S \leq 18, SF-S $>$ 18), cluster 1 of SF-S $>$ 18 had the highest values (P <0.05) of most kinetic parameters (VSL, VAP, LIN, STR, BCF and WOB), while cluster 2 of the SF-S \leq 18 group had the smallest values (P <0.05). Cluster 1 of the SC group had the highest values for VSL, VAP, LIN, STR, BCF and WOB in relation to the SF-S and SR groups (P <0.05). It is concluded that the number, characteristics and proportion of the subpopulations of mobile sperm are influenced by the selection of ram by age and andrological criteria and by the methods of seminal conservation. The subpopulations are more heterogeneous in the fresh semen of adult ram compared to the young ones submitted to the selection and, more homogeneous in refrigerated and frozen seminal samples.

Keywords: Ovine, sperm kinetics, CASA, andrological, semen cooling, semen freezing.

INTRODUÇÃO GERAL

A ovinocultura é uma atividade pecuária importante para o desenvolvimento socioeconômico do Brasil. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017), o efetivo ovino no ano de 2017 somou cerca de 17,98 milhões de cabeças, com o Nordeste se destacando com 64,22% do rebanho nacional, o que demonstra sua importância para a região. Contudo, o país ainda possui um rebanho ovino pouco especializado, com índices produtivos médios insatisfatórios (PIRES et al., 2015) e com poucos avanços no progresso genético.

O desempenho reprodutivo é um dos fatores que deve ser levado em consideração para a obtenção da máxima produtividade nos sistemas, sendo necessário o uso de ferramentas que possibilitem melhores índices de fertilidade, desde a seleção de reprodutores até as técnicas reprodutivas como a inseminação artificial (IA) que, associadas ao melhoramento genético, representam umas das principais formas para aumentar a produção e a produtividade da ovinocultura, possibilitando a disseminação de material genético de animais com características produtivas superiores.

A seleção prévia de machos com elevado potencial reprodutivo é de suma importância, pois carneiros com bom desempenho sexual podem servir um maior número de ovelhas, aumentando a pressão de seleção com a maior difusão dos seus genes (PACHECO; QUIRINO, 2010). Nesse contexto, a análise de sêmen é um dos principais critérios de seleção que deve ser considerada na escolha desses reprodutores, por permitir uma avaliação do potencial de fertilidade do carneiro (HAFEZ, 1995) e do seu rendimento e desempenho nas biotecnologias da reprodução.

A motilidade espermática é um dos parâmetros usados para avaliação da qualidade do sêmen, fornecendo informações importantes sobre sua capacidade de fertilização no oviduto (YÁNIZ et al., 2006). O movimento dos espermatozoides é avaliado usualmente através de análises subjetivas da motilidade, porém com o desenvolvimento da avaliação da cinética espermática assistida por computador (CASA), é possível analisar de forma objetiva vários parâmetros de muitas células em uma única amostra (MORTIMER, 2000; DEL OLMO et al., 2013), diferindo cada uma de acordo com as suas características cinéticas (THURSTON et al., 2001).

O sêmen é composto por um grupo heterogêneo de espermatozoides (subpopulações) que diferem quanto a sua morfologia (VICENTE-FIEL et al., 2013; PEÑA et al., 2005),

cinética (QUINTERO-MORENO et al., 2003) e até sua resposta a estímulos fisiológicos ou biotecnológicos (MARTINEZ-PASTOR et al., 2005). A identificação das subpopulações espermáticas se faz relevante por fornecer informações sobre a qualidade do sêmen, permitindo que sejam selecionados machos que possuam maior porcentagem de células com características estruturais e funcionais superiores, e que tenham melhor desempenho ao serem submetidos à reprodução natural ou às técnicas da reprodução (MENDONZA et al., 2012; FERRAZ et al., 2014).

Vários estudos utilizaram o CASA associado a *softwares* específicos e procedimentos estatísticos multivariados para caracterizar amostras seminais de diferentes espécies, fornecendo informações relevantes quanto às características biológicas dos espermatozoides (QUINTERO-MORENO et al., 2003; MUIÑO et al., 2008; DORADO et al., 2010; BRAVO et al., 2011; MARTÍ et al., 2012; PEÑA et al., 2012; KANUGA et al., 2012; DORADO et al., 2013; GALLEGO et al., 2017; KANNO et al., 2017). A análise dos dados obtidos pelo CASA, associada a métodos estatísticos, tem interesse prático como método de avaliação seminal. Isso possibilita a identificação e avaliação de diferentes grupos cinéticos de espermatozoides e, conseqüentemente, a sua heterogeneidade (QUINTERO-MORENO et al., 2003), que por sua vez, reflete a variabilidade do sêmen e sua capacidade de responder a diferentes situações *in vitro* e *in vivo*, que reflete na sua fertilidade (VYT et al., 2008). Assim, o estudo das subpopulações espermáticas, baseado na cinética, pode ser utilizado para subsidiar as avaliações da qualidade das amostras *in natura* para fins de seleção de reprodutores, para acasalamento ou para doadores de sêmen, assim como para controle de qualidade das amostras submetidas à conservação pela refrigeração e congelamento.

O presente trabalho teve como objetivo identificar, caracterizar e analisar a dinâmica das subpopulações espermáticas no sêmen fresco, refrigerado e congelado de ovinos, analisando as alterações da sua distribuição e características cinéticas decorrentes dos processos de seleção etária e andrológica dos reprodutores e métodos de conservação seminal.

REFERÊNCIAS

BRAVO, J. A.; MONTANERO, J.; CALERO, R.; ROY, T. J. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. **Animal Reproduction Science**, v. 129, p. 22-29, 2011.

DORADO, J.; ACHA, D.; GÁLVEZ, M. J.; ORTIZ, I.; CARRASCO, J. J.; DÍAZ, B.; GÓMEZ-ARRONES, V.; CALERO-CARRETERO, R.; HIDALGO, M. Sperm motility patterns in Andalusian donkey (*Equus asinus*) semen: Effects of body weight, age, and semen quality. **Theriogenology**, v. 79, p. 1100-1109, 2013.

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, p. 795-804, 2010.

DEL OLMO, E.; BISBAL, A.; MAROTO-MORALES, A.; GARCÍA-ALVAREZ, O.; RAMON, M.; JIMENEZ-RABADAN, P.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; SOLER, A. J.; GARDE, J. J.; FERNANDEZ-SANTOS M. R. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. **Animal Reproduction Science**, v. 138, p. 102-109, 2013.

FERRAZ, M. A. M. M.; MORATÓ, R.; YESTE, M.; ARCARONS, N.; PENA, A. I.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; MUIÑO, R.; MOGAS, T. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm–oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. **Theriogenology**, v. 81, p. 1067-1072, 2014.

GALLEGO, V.; CAVALCANTE, S. S.; FUJIMOTO, R. Y.; CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C.; MARIA, A. N. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma acropomum*). **Theriogenology**, v. 87, p. 16-24, 2017.

HAFEZ, E.S.E. Transporte e sobrevivência de gametas. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 6 ed., Manole, São Paulo, p. 146-166, 1995.

IBGE. Pesquisa da pecuária municipal. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>>. Acesso em: 05 de jun. de 2019.

KANNO, C.; SAKAMOTO, K.; YANAGAWA, Y.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S.; NAGANO, M. Comparison of sperm subpopulation structures in first and second ejaculated semen from Japanese black bulls by a cluster analysis of sperm motility evaluated by a CASA system. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, p. 1359-1365, 2017.

KANUGA, M. K.; DREW, R. E.; WILSON-LEEDY, J. G.; INGERMANN, R. L. Subpopulation distribution of motile sperm relative to activation medium in steel head (*Oncorhynchus mykiss*). **Theriogenology**, v. 77, p. 916-925, 2012.

MARTÍ, J. I.; APARICIO, I. M.; LEAL, C. L. V.; GARCÍA-HERREROS, M. Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality

parameters in ram ejaculates. **Theriogenology**, v. 78, p. 528-541, 2012.

MENDOZA, N.; CASAO, A.; DEL VALLE, I.; SERRANO, E.; NICOLAU, S.; ASUMPCÃO, M. E. O. A.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; PÉREZ-PÉ, R. Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography**, v. 880, p. 74-81, 2012.

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

MORTIMER, S. T. CASA-practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 514-524, 2000.

MUIÑO, R.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; PEÑA, A. I. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 27-39, 2008.

PACHECO, A.; QUIRINO, C.R. Comportamento sexual em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p.87-97, 2010.

PEÑA, A. I.; BARRIO, M.; BECERRA, J. J.; QUINTELA, L. A.; HERRADÓN, P. G. Motile sperm subpopulations in frozen–thawed dog semen: Changes after incubation in capacitating conditions and relationship with sperm survival after osmotic stress. **Animal Reproduction Science**, v. 133, p. 214-223, 2012.

PEÑA, F. J.; SARAVIA, F.; GARCÍA-HERREROS, M.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; TAPIA, J. A.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to post thaw quality. **Journal of Andrology**, v. 26, p. 716-723, 2005.

PIRES, M. P.; FARAH, M. M.; CARREÑO, L. O. D.; UTSUNOMIYA, A. T. H.; ONO, R. K.; BERTIPAGLIA, T. S.; FONSECA, R. Estimativas de parâmetros genéticos para características de crescimento em ovinos da raça Suffolk no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 1119-1124, 2015.

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

THURSTON, L. M.; WATSON P. F.; MILEHAM, A. J.; HOLT, W. V. V. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 382-394, 2001.

VICENTE-FIEL S.; PALACÍN I.; SANTOLARIA P.; YÁNIZ J. L. A comparative study

of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). **Animal Reproduction Science**, v. 139, p. 182-189, 2013.

VYT, P.; MAES, D.; QUINTEN, C.; RIJSSELAERE, T.; DELEY, W.; AERTS, M. DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Detailed motility examination of porcine semen and its predictive value towards reproductive performance in sows. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 77, p. 291-298, 2008.

YÁNIZ, J. L.; LOPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R. H. F. Scanning Electron Microscopic Study of the Functional Anatomy of the Porcine Oviductal Mucosa. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 35, p. 28-34, 2006.

CAPÍTULO – ARTIGO

CAPÍTULO: ALTERAÇÕES NAS SUBPOPULAÇÕES DE ESPERMATOZOIDES MÓVEIS DE CARNEIROS SUBMETIDOS A CRITÉRIOS DE SELEÇÃO E MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO SEMINAL.¹

¹O presente artigo foi formatado segundo as normas do periódico *Theriogenology*.

CAPÍTULO: Alterações nas subpopulações de espermatozoides móveis de carneiros submetidos a critérios de seleção e métodos de conservação seminal.

D. A. Oliveira^a, A. Bidegain^b, A. N. Maria^c, H. C. Azevedo^{abc}

^aPrograma de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil

^bPrograma de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil

^cEmbrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe, Brasil
Av. Beira Mar, nº 3.250, Jardins, Aracaju, SE – Brasil. E-mail:
hymerson.azevedo@embrapa.br

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio da análise cinética computadorizada (CASA), a influência dos processos de seleção e métodos de conservação seminal sobre o número, característica e proporção das subpopulações espermáticas. Foi avaliada a cinética de 337.606 espermatozoides distribuídos nos grupos: sêmen fresco de carneiros sem nenhuma seleção (SF-T); sêmen fresco de carneiros selecionados por exame andrológico (SF-S); sêmen fresco de carneiros jovens com idade entre 10 e 18 meses (SF-S \leq 18) e adultos entre 19 e 58 meses (SF-S $>$ 18) selecionados por exame andrológico; sêmen refrigerado (SR) e congelado (SC) de carneiros selecionados por exame andrológico. Os dados gerados foram tabulados, analisados, relativizados e avaliados pelo método de agrupamento *Two-Step Cluster*. Os grupos SF-T e SR-S apresentaram três subpopulações cada; o grupo SF-S $>$ 18 foi o mais heterogêneo com quatro; já os grupos SF-S \leq 18, SR e SC apresentaram apenas duas subpopulações. Entre os clusters dos grupos de carneiros selecionados (SF-S, SF-S \leq 18, SF-S $>$ 18), o cluster 1 do SF-S $>$ 18 apresentou os maiores valores ($P<0,05$) para a maioria dos parâmetros cinéticos (VSL, VAP, LIN, STR, BCF e WOB), enquanto o cluster 2 do grupo SF-S \leq 18 os menores ($P<0,05$). O cluster 1 do grupo SC apresentou os maiores valores médios para VSL, VAP, LIN, STR, BCF e WOB em relação aos grupos SF-S e SR ($P<0,05$). Conclui-se que o número, característica e proporção das subpopulações espermáticas do sêmen variam de acordo com a seleção etária e andrológica, e aos processos de conservação seminal. As subpopulações são mais heterogêneas no sêmen fresco de carneiros adultos em relação aos jovens submetidos à seleção, e mais homogêneas em amostras seminais refrigeradas e congeladas.

Palavras-chave: Ovinos, cinética espermática, CASA, andrológico, refrigeração do sêmen, congelamento do sêmen.

CHAPTER: Changes in the motile sperm subpopulations from ram submitted to selection criteria and seminal conservation methods.

D. A. Oliveira^a, A. Bidegain^b, A. N. Maria^c, H. C. Azevedo^{abc}

^a Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

^c Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe, Brazil
Av. Beira Mar, nº 3.250, Jardins, Aracaju, SE – Brazil. E-mail:
hymerson.azevedo@embrapa.br

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate, through computerized system analysis (CASA), the influence of selection processes and seminal conservation methods on the number, characteristics and proportion of sperm subpopulations. The kinetics of 337,606 sperm distributed in the groups were evaluated: fresh semen from ram without any selection (SF-T), fresh semen from ram selected by andrological examination (SF-S), fresh semen from young ram aged 10 to 18 months selected by andrological examination (SF-S \leq 18) and adults between 19 and 58 months (SF-S $>$ 18) and refrigerated (SR) and frozen (SC) semen from ram selected by andrological examination. The generated data were tabulated, analyzed, relativized and evaluated by the Two-Step Cluster clustering method. The SF-T and SR-S groups had three subpopulations each; the SF-S $>$ 18 group was the most heterogeneous with four; the SF-S \leq 18, SR and SC groups had only two subpopulations. Among the clusters of the selected ram groups (SF-S, SF-S \leq 18, SF-S $>$ 18), cluster 1 of SF-S $>$ 18 had the highest values ($P < 0.05$) of most kinetic parameters (VSL, VAP, LIN, STR, BCF and WOB), while cluster 2 of the SF-S \leq 18 group had the smallest values ($P < 0.05$). Cluster 1 of the SC group had the highest values for VSL, VAP, LIN, STR, BCF and WOB in relation to the SF-S and SR groups ($P < 0.05$). It is concluded that the number, characteristics and proportion of semen sperm subpopulations vary according to age and andrological selection, and seminal conservation processes. The subpopulations are more heterogeneous in the fresh semen of adult ram compared to the young ones submitted to the selection and, more homogeneous in refrigerated and frozen seminal samples.

Keywords: Ovine, sperm kinetics, CASA, andrological, semen cooling, semen freezing.

1. Introdução

A avaliação cinética dos espermatozoides é uma importante ferramenta de seleção de reprodutores e amostras seminais para o manejo reprodutivo e programas de inseminação artificial (IA) com uso de sêmen refrigerado e congelado, potencializando a aplicabilidade das técnicas e a disseminação do material genético de qualidade a diferentes rebanhos.

A análise computadorizada do sêmen permite diminuir a subjetividade da avaliação da cinética espermática, considerando a variabilidade nos padrões de movimento dos espermatozoides dentro de um mesmo ejaculado [1] ou amostra. Diversos trabalhos abordaram a avaliação computadorizada da cinética espermática associada à análise estatística multivariada, identificando e caracterizando agrupamentos de células móveis no sêmen [2–11]. A análise de cluster é um desses métodos de estatística multivariada que formam grupos de espermatozoides usando parâmetros de um grande conjunto de dados [3]. Assim, é possível determinar o número e a proporção, além de caracterizar subpopulações de espermatozoides com diferentes comportamentos cinéticos em amostras de sêmen.

O número e as características das subpopulações espermáticas em uma amostra podem ser influenciados por diversos fatores, dentre os quais, genéticos e individuais [12,13], ambientais, como sazonalidade [10], etários [14] e aqueles ligados a processos de conservação do sêmen, a exemplo da criopreservação [15]. Acredita-se que as diferenças entre as células espermáticas em mamíferos são adquiridas durante a espermatogênese e maturação no epidídimo, que possui espermatozoides em diferentes estágios de desenvolvimento [16].

O ejaculado é composto por um grupo heterogêneo de espermatozoides que se distinguem entre si quanto a seus padrões estruturais, como a morfometria de cabeça e cauda [17], e funcionais, como a sua capacidade de sofrer capacitação em diferentes condições [18] e a cinética [6]. Essa heterogeneidade garante um maior potencial deste grupo de espermatozoides em fertilizar o oócito [19]. Para algumas espécies de mamíferos é importante que existam no ejaculado diferentes subpopulações espermáticas que estejam preparadas para a fertilização em diferentes momentos e situações [20].

A análise e a identificação da heterogeneidade funcional, a exemplo da cinética, é relevante por permitir selecionar grupos de espermatozoides de melhor qualidade [21], maior resistência ao processo de criopreservação [2] e maior capacidade de fertilização do oócito [19,22]. Assim, vários trabalhos já identificaram e reconheceram a presença de subpopulações

espermáticas em amostras seminais de diversas espécies, como em bovinos [2,15], caprinos [4], caninos [5], equinos [6,7], peixes [8,9] e também em ovinos [10,11], tendo sido identificada relação com a fertilidade do sêmen [19].

Os estudos de subpopulação espermática em ovinos se restringem à sua identificação, classificação, caracterização e análises de frequência no sêmen fresco [10] ou criopreservado [23]. Contudo, até o momento, não foram realizados em um único trabalho estudos comparativos das alterações nas subpopulações de espermatozoides móveis advindas da seleção de reprodutores e da refrigeração e congelação do sêmen em ovinos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência dos critérios de seleção de reprodutores e métodos de conservação seminal sobre o número, características e proporção das subpopulações de espermatozoides móveis no sêmen de carneiros.

2. Material e Métodos

Foram utilizadas informações do banco de dados de análise computadorizada da cinética espermática geradas a partir de amostras de sêmen obtidas e submetidas aos mesmos procedimentos padrões, desde a coleta até a sua avaliação. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Embrapa Tabuleiros Costeiros (protocolos: 18112015.0001 e 13072016.0006).

Os trabalhos de campo foram conduzidos no Núcleo de Conservação *in situ* de Ovinos Santa Inês da Embrapa Tabuleiros Costeiros, no Campo Experimental Pedro Arle (Frei Paulo-SE, Brasil), situado geograficamente na latitude de 10°36'12.63" Sul e longitude de 37°38'30.41" Oeste. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LABRA), na sede da Embrapa Tabuleiros Costeiros, município de Aracaju, Brasil.

2.1 Animais experimentais e manejo

Foram utilizados dados de carneiros da raça Santa Inês com idade entre 10 e 58 meses, mantidos em sistema do tipo semi-intensivo com forragens nativas e cultivadas, compostas pelos capins pangola (*Digitaria decumbens* L), estrela (*Cynodon nlemfuensis*), buffel (*Cenchrus ciliaries*) e Panicum maximum cv. aruana e *green-panic*, durante o dia, e suplementação com volumoso (V) de silagem de milho e concentrado (C) à base de farelo de soja e farelo de milho na proporção 50V:50C, ao serem recolhidos para pernoitar em

estábulo à noite. Todos os animais receberam sal mineral específico para ovinos e água *ad libitum*.

2.2 Coleta e processamento do sêmen

A coleta seminal foi realizada por meio de vagina artificial aquecida (43-45°C), com uso de ovelhas em estro natural como estímulo sexual para os carneiros. Os ejaculados foram avaliados no estado fresco *in natura* ou submetidos à conservação por refrigeração ou por criopreservação.

2.2.1 Refrigeração do sêmen

Amostras de sêmen foram diluídas considerando-se a quantidade de espermatozoides (100×10^6) e o volume (0,25 mL) da dose inseminante, o que correspondeu a uma concentração final de 400×10^6 sptz/mL. O meio diluidor utilizado foi à base de Glicina-Gema-Leite (GGL) [24], com modificações como: aquecimento do leite desnatado (92-95°C, 10 minutos), para inativar fatores tóxicos e frações proteicas [25]; substituição dos antibióticos da fórmula original por sulfato de gentamicina [26,27]; e remoção do crioprotetor glicerol da formulação. Ao final, o meio GGL modificado apresentou pH e osmolaridade médios de 7,1 e 318 mOsm/Kg, respectivamente. Em seguida, as amostras de sêmen diluído foram envasadas em palhetas francesas de 0,25mL, acondicionadas em saco de polietileno atóxico e depositadas no interior de um tubo de vidro envolto em álcool absoluto, dentro de um recipiente plástico. As amostras foram colocadas em um refrigerador ajustado à temperatura de 5°C, obtendo-se uma taxa de refrigeração média de 0,22°C/minuto [27]. O sêmen diluído foi mantido no refrigerador a 5°C por 48 ou 72 horas até a sua avaliação, não havendo diferença entre os momentos quanto aos parâmetros cinéticos, sendo estes agrupados em um único grupo experimental de sêmen refrigerado (SR).

2.2.2 Criopreservação do sêmen

Amostras de sêmen foram submetidas à congelação em meio diluidor GGL [24], com as mesmas modificações relatadas no processo de refrigeração, porém com adição de 5% do crioprotetor glicerol, apresentando médias de pH 7,0 e osmolaridade de 1400 mOsm/Kg. O sêmen também foi envasado em palhetas francesas de 0,25mL com 100×10^6 espermatozoides, correspondendo à mesma concentração final (400×10^6 sptz/mL).

A congelação foi feita de forma automatizada transferindo-se as palhetas contendo o sêmen diluído para a máquina (TK 4000®, TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba-

MG), programada para executar uma curva de refrigeração a uma velocidade de 0,25°C/minuto até 5°C, com manutenção dessa temperatura até completar 120 minutos do início do processo. A etapa subsequente de congelação foi realizada a uma velocidade de -20°C/minuto até atingir -140°C, quando as palhetas de sêmen foram imersas em nitrogênio líquido (N₂L) para serem colocadas em raques e armazenadas em botijão criogênico na temperatura final (-196°C).

2.3 Avaliação computadorizada da cinética espermática

Amostras de sêmen fresco, refrigerado e criopreservado foram submetidas à análise computadorizada da cinética espermática (CASA). As amostras de sêmen fresco e refrigerado foram imediatamente avaliadas, enquanto aquelas de sêmen congelado foram descongeladas em banho-maria a 40°C por 20 segundos para serem submetidas à avaliação.

As amostras foram previamente diluídas em uma solução avaliadora pré-aquecida a 37°C [27], a uma concentração de 20×10^6 sptz /mL. Depois de homogeneizadas e mantidas a 37°C por 5 minutos, foram pipetadas alíquotas das amostras diluídas para a câmara de Makler® (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel), pré-aquecida a 37°C, para captura e análise de imagens por meio de uma câmara de vídeo (Basler Vision Technologies® 602FC, Ahrensburg, Alemanha) conectada a um microscópio com contraste de fase (Nikon® 50i, Japão), com objetiva sob aumento de 100 vezes.

A captura foi feita a uma velocidade de 100 imagens/segundo, com seleção manual de quatro campos equidistantes de um mesmo ponto central, capturando-se no mínimo 500 células por amostra e uma média de 150 células por campo. As imagens capturadas foram analisadas pelo *Sperm Class Analyzer* (SCA®, Microptics, S.L. Versão 5.0, Barcelona, Espanha), tendo-se como padrão o *set-up* de fábrica para a espécie ovina com ajustes de partículas com área entre 30 e 70 μm^2 . Foram analisados os parâmetros cinéticos: velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade do percurso médio (VAP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) e índice de oscilação (WOB). Foram considerados como móveis apenas aqueles espermatozoides que apresentaram valores de VCL superiores a 10 μm /segundo. As células espermáticas foram classificadas em lentas, médias e rápidas, de acordo com o valor do VCL < 100 μm /segundo, $\geq 100 \mu\text{m}$ /segundo e < 200 μm /segundo, e $\geq 200 \mu\text{m}$ /segundo, respectivamente. Além disso, aqueles

espermatozoides que apresentaram valores de STR $\geq 70\%$ e LIN $\geq 40\%$ foram considerados progressivos e lineares, respectivamente.

2.4 Caracterização dos grupos e delineamento experimental

Os dados da cinética espermática foram divididos nos seguintes grupos experimentais formados a partir de amostras de sêmen de animais que atendiam a critérios etários (≤ 18 ou > 18 meses de idade), baseados no trabalho de Mandiki et al. [28] que relataram que a maturidade sexual dos carneiros foi alcançada aos 17 e 18 meses de idade, e a critérios andrológicos (ejaculados com número total de espermatozoides $\geq 3 \times 10^9$, motilidade espermática avaliada subjetivamente $\geq 75\%$, e percentual de espermatozoides com morfologia normal $\geq 80\%$, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal-CBRA [29]) e que foram conservadas por diferentes métodos (refrigeração ou congelamento):

- SF-T - Sêmen fresco (SF) de carneiros sem seleção etária e andrológica (138.626 espermatozoides);
- SF-S - Sêmen fresco de carneiros oriundos do SF-T, selecionados (S) pelos critérios andrológicos (69.338 espermatozoides);
- SF-S ≤ 18 - Sêmen fresco de carneiros contemporâneos e jovens (10 a 18 meses de idade) oriundo do SF-T, selecionados pelos critérios andrológicos (17.419 espermatozoides);
- SF-S > 18 - Sêmen fresco de carneiros não contemporâneos e adultos (19 a 58 meses de idade) oriundo do SF-T, selecionados pelos critérios andrológicos (51.919 espermatozoides);
- SR - Sêmen refrigerado (SR) de carneiros adultos selecionados previamente pelos critérios andrológicos (14.816 espermatozoides);
- SC - Sêmen congelado (SC) de carneiros adultos selecionados previamente pelos critérios andrológicos (45.488 espermatozoides).

2.5 Processamento dos dados e análise estatística

Os dados obtidos a partir dos parâmetros de cinética espermática (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF e WOB) originários dos grupos experimentais (SF-T; SF-S; SF-S ≤ 18 ; SF-S > 18 ; SR; SC) foram ajustados por meio da relativização, em que cada valor foi dividido pelo somatório de todos os valores do parâmetro [30], possibilitando a interpretação de todos os dados em uma mesma unidade de medida.

Em seguida, os dados dos parâmetros cinéticos foram avaliados utilizando-se o método estatístico de análise multivariada *Two-Step Cluster*, disponível no software SPSS

13.0, segundo procedimentos descritos por Beirão et al. [31] e Martínez-Pastor et al. [32], sendo cada espermatozoide considerado uma repetição dentro do grupo. A realização desse procedimento levou em consideração a distância entre os grupos através do cálculo de log-verossimilhança e o critério bayesiano de Schwarz (BIC), os quais auxiliam a formação dos clusters dentro de cada grupo experimental.

Depois da definição dos clusters, as médias de cada parâmetro foram comparadas entre si a fim de diferenciar as subpopulações espermáticas entre os grupos experimentais. Os dados foram submetidos à avaliação de normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk, não apresentando distribuição normal mesmo após a transformação. Assim, foi aplicada a estatística não paramétrica, utilizando-se uma análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis. As comparações das médias foram feitas considerando-se 95% de nível de confiança usando-se o pacote estatístico SAS (SAS Institute, Inc., 2010).

3. Resultados

Estão apresentadas na Tabela 1 as médias dos parâmetros cinéticos dos espermatozoides dos grupos experimentais. O grupo de sêmen fresco de carneiros selecionados pelos critérios andrológicos (SF-S) apresentou menores valores médios ($P < 0,05$) dos parâmetros cinéticos VCL, VSL, VAP, ALH, BCF e WOB em comparação ao grupo de sêmen fresco de carneiros sem seleção (SF-T). Apenas os parâmetros LIN e STR não diferiram entre esses grupos ($P > 0,05$).

O grupo de sêmen fresco de carneiros jovens selecionados ($SF-S \leq 18$) obteve menores valores médios ($P < 0,05$) para os parâmetros VCL, VSL, VAP, ALH e BCF quando comparado ao grupo SF-S, sendo semelhante entre si para LIN, STR e WOB ($P > 0,05$). Já o grupo de sêmen fresco de carneiros adultos selecionados ($SF-S > 18$) obteve maiores valores médios ($P < 0,05$) para os parâmetros VCL, VSL, VAP, ALH e BCF quando comparado com o grupo SF-S sendo semelhantes entre si para LIN, STR e WOB ($P > 0,05$). O $SF-S \leq 18$ apresentou menores valores que o $SF-S > 18$ para VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH e BCF ($P < 0,05$) sendo iguais apenas para WOB ($P > 0,05$).

O grupo de sêmen refrigerado (SR) obteve menores médias em todos os parâmetros cinéticos ($P < 0,05$) quando comparado com o grupo SF-S. Já o sêmen congelado (SC), apresentou menores valores médios ($P < 0,05$) que o SF-S para a maioria dos parâmetros (VCL, VSL, VAP, STR, ALH e BCF). Já para as variáveis LIN e WOB maiores médias foram obtidas no grupo SC em comparação com o SF-S ($P < 0,05$). Na comparação entre os

métodos de conservação seminal, verificou-se que o SR apresentou valores inferiores ($P<0,05$) ao SC para quase todos os parâmetros (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, BCF e WOB), à exceção do ALH que foi maior ($P<0,05$).

Nas Tabelas 2 e 3 estão expostos a quantidade, os valores médios dos parâmetros cinéticos e as proporções de espermatozoides das subpopulações (cluster) espermáticas para cada grupo experimental. O SF-T e SF-S apresentaram a formação de três clusters cada um, sendo que a soma dos clusters 1 e 2 destes dois grupos, caracterizados por apresentarem células espermáticas rápidas, lineares e progressivas, representaram 81,20% e 82,90% do total de espermatozoides em cada grupo, respectivamente. Já os clusters 3 de ambos os grupos, apresentaram células com velocidade mediana, não lineares e não progressivas. Comparando-se as subpopulações desses grupos quanto às médias dos parâmetros cinéticos, verificou-se que o cluster 1 do SF-T foi o que apresentou os maiores valores ($P<0,05$): VSL, VAP e BCF foram maiores e LIN, STR e WOB foram um dos maiores. Já o cluster 3 do grupo SF-S apresentou os menores valores para todas as variáveis avaliadas em comparação com os demais clusters de ambos os grupos ($P<0,05$).

No grupo SF-S \leq 18 foi observada a formação de apenas duas subpopulações sendo o cluster 1 com o predomínio de 77,90% de espermatozoides caracterizados como rápidos, lineares e progressivos, enquanto o cluster 2, caracterizou-se por conter espermatozoides lentos, não lineares e não progressivos em menor proporção (22,10%). No grupo SF-S $>$ 18 foi observada a formação de quatro clusters sendo os de número 1, 2 e 3 os que contiveram células espermáticas rápidas, lineares e progressivas, somando 84,20% do total de espermatozoides, enquanto o cluster 4, em menor proporção (15,80%), foi caracterizado por conter células com velocidade mediana não lineares e não progressivas.

Na comparação das subpopulações dos grupos cujos carneiros foram selecionados por critérios andrológicos (SF-S, SF-S \leq 18 e SF-S $>$ 18), observou-se que o cluster 1 do SF-S $>$ 18 foi o que apresentou os maiores valores ($P<0,05$) da maioria dos parâmetros cinéticos: uma das maiores médias de VCL e as maiores médias de VSL, VAP, LIN, STR, BCF e WOB. Já o cluster 2 do grupo SF-S \leq 18 foi o que teve as menores médias para todos os parâmetros entre os grupos de sêmen de carneiros selecionados ($P<0,05$).

Os grupos de amostras de sêmen conservado (SR e SC) apresentaram duas subpopulações cada, com os clusters 1 de ambas, caracterizados por apresentarem espermatozoides rápidos, lineares e progressivos, correspondendo a 57,20% e 59,90% do total de células, respectivamente. Os clusters 2 desses grupos foram caracterizados por células

espermáticas lentas, não lineares e não progressivas, e representaram 42,80% (SR) e 40,10% (SC) do total de espermatozoides das amostras de sêmen. Na comparação entre as subpopulações dos grupos de sêmen conservado (SR e SC) e do sêmen fresco (SF-S) de carneiros selecionados, encontrou-se que o cluster 1 do SC apresentou as maiores médias ($P < 0,05$) para a maioria dos parâmetros cinéticos: VSL, VAP, LIN, STR, BCF e WOB. Em contrapartida, o cluster 2 do SC foi o que apresentou um maior número de parâmetros cinéticos com os menores ou um dos menores valores ($P < 0,05$): VCL, VSL, VAP e ALH.

Na Figura 1 estão apresentadas graficamente as distribuições das subpopulações de espermatozoides móveis dos grupos experimentais considerando-se cada carneiro. Os carneiros variaram entre si quanto ao número de subpopulações espermáticas nos grupos SF-T, SF-S e SF>18, e quanto as suas proporções de espermatozoides em todos os grupos.

4. Discussão

A análise das subpopulações espermáticas tem sido amplamente discutida, pois estudos demonstram que a heterogeneidade de uma amostra de sêmen pode estar correlacionada com a fertilidade do macho. A avaliação computadorizada da cinética espermática associada à análise estatística multivariada tem possibilitado a identificação e caracterização de diferentes grupos de espermatozoides móveis refletindo assim a heterogeneidade de uma amostra seminal quanto ao movimento espermático [6,33,34,12].

Quanto maior for a heterogeneidade espermática de uma amostra de sêmen, maiores serão as diferenças entre os espermatozoides quanto às suas características ou aptidões e, esta diversidade celular, pode aumentar as chances de um determinado ejaculado ou amostra ter sucesso em um acasalamento natural ou em uma biotecnologia da reprodução, como a fertilização *in vitro* (FIV) e inseminação artificial [20]. Assim, a identificação de subpopulações de espermatozoides proporciona melhorias nas técnicas de avaliação da qualidade seminal, potencializando os procedimentos de seleção de reprodutores e de fertilização artificial [35,36].

A maior quantidade de subpopulações espermáticas reflete em uma maior heterogeneidade do sêmen. Uma amostra de sêmen heterogênea é caracterizada por conter distintas populações de espermatozoides em diferentes níveis de maturação e estado biológico, que são capazes de fertilizar o oócito em diferentes momentos [20], ambientes e situações de acordo com a sua aptidão. A competência fertilizante do espermatozoide depende

de sua capacidade de se adaptar ao novo ambiente no trato genital feminino, sofrer a capacitação adquirindo a capacidade de interagir e fertilizar o oócito [37].

Diferentes números de subpopulações já foram descritos no sêmen de ovinos, variando de 3 a 5 subpopulações [10,13,36,38]. Bravo et al. [10] relataram a ocorrência de cinco subpopulações espermáticas no sêmen de ovinos da raça Ile de France com prevalência de espermatozoides rápidos. Os referidos autores utilizaram uma configuração do sistema de análise computadorizada da cinética diferente deste trabalho, considerando células com VCL superior a 70 $\mu\text{m}/\text{segundo}$ como rápidas e $\text{STR} \geq 80\%$ como progressivas, o que pode explicar as diferenças entre os resultados relatados neste trabalho que obteve de 2 a 4 subpopulações no sêmen fresco. Além disso, essa variação no número de subpopulações pode ser atribuída às diferenças entre raças, sendo o nosso trabalho o primeiro relatado na raça Santa Inês.

A influência dos processos de seleção de reprodutores sobre a heterogeneidade espermática no sêmen não tinha sido avaliada até o presente momento. Além disso, um estudo comparando como se comporta essa heterogeneidade nos diferentes processos de conservação do sêmen também não havia sido feito até então. No presente estudo, a cinética de 337.606 espermatozoides, avaliada pela associação entre o sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA) e a estatística de agrupamento *Two-Step Cluster*, foi capaz de determinar os efeitos da seleção prévia dos carneiros pela faixa etária e exame andrológico, e pelos processos de conservação do sêmen, como a refrigeração e a criopreservação, sobre o número, característica e distribuição de diferentes subpopulações de espermatozoides móveis.

Os valores médios da maioria dos parâmetros cinéticos avaliados do grupo de sêmen fresco de carneiros sem seleção andrológica (SF-T) foram superiores comparados ao grupo de sêmen fresco de carneiros selecionados (SF-S). Embora tenha apresentado valores cinéticos médios inferiores ao grupo SF-T, o SF-S apresentou proporção semelhante de espermatozoides velozes, lineares e progressivos (cluster 1 e cluster 2) que aquela observada no grupo SF-T (82,90% vs. 81,20%). Além disso, o grupo SF-S apresentou proporção semelhante de espermatozoides móveis (91,78%) em relação ao grupo SF-T (90,83%). Assim, aparentemente, a seleção por critérios andrológicos básicos preconizados pelo CBRA [29] não alterou a heterogeneidade espermática do sêmen fresco de carneiros, o que pode ser uma grande vantagem já que a manutenção da diversidade das células espermáticas pode garantir sua maior fertilidade frente ao variado espectro de situações a que elas são submetidas, seja *in vivo* ou *in vitro*.

A análise da proporção de subpopulações de espermatozoides com alta velocidade, de maior linearidade e mais progressivos pode ser usada como uma ferramenta poderosa para mensurar a capacidade de fertilização de um animal [10] ou amostra seminal. Espermatozoides com maior velocidade em linha reta podem ter melhor desempenho no transporte espermático através do trato reprodutivo e na penetração do oócito [39]. O transporte espermático no trato reprodutivo da fêmea é caracterizado por um deslocamento rápido dos espermatozoides em um curto período até a chegada ao local de fertilização, e pela formação de reservatórios, que promovem a liberação prolongada destas células [40]. O sêmen com uma maior proporção de espermatozoides com parâmetros cinéticos de maior velocidade, linearidade e progressividade são mais eficientes e suscetíveis a conseguirem atravessar a barreira de muco do trato reprodutivo da fêmea [36], sendo fortemente relacionada com a capacidade de fertilização [41,42].

O grupo de amostras de sêmen fresco de carneiros jovens de 10 a 18 meses de idade e contemporâneos (SF-S \leq 18) apresentou os menores valores médios para a maioria dos parâmetros cinéticos e menor número de subpopulações espermáticas em relação ao grupo de carneiros adultos de 19 a 58 meses de idade (SF-S $>$ 18). Entretanto, o total de espermatozoides móveis para ambos os grupos foi semelhante, 91,55% e 91,86%, para os grupos SF-S \leq 18 e SF-S $>$ 18, respectivamente. Os menores valores médios para a maioria dos parâmetros cinéticos e menor número de subpopulações espermáticas do grupo de carneiros jovens, talvez possa ser explicado pela menor maturidade sexual desses animais, refletindo-se na produção espermática. Trabalhos demonstraram que machos mais jovens possuem diferenças quanto à morfometria espermática [43] com um maior número de espermatozoides defeituosos e de menor motilidade quando comparados àqueles de machos adultos [44,45]. Apesar dos carneiros jovens terem sido aprovados pelos critérios recomendados pelo CBRA [29], o processo de seleção andrológica empregado rotineiramente de forma subjetiva, talvez não seja capaz de identificar diferenças morfológicas e funcionais sutis nos espermatozoides destes animais que podem ter interferido na sua cinética.

A menor heterogeneidade celular em animais jovens também foi encontrada por Martín et al. [11], que ao avaliarem a morfologia espermática no sêmen descongelado, verificaram que os animais mais maduros (36 meses) apresentaram quatro subpopulações bem definidas, enquanto os animais mais jovens (12 meses) possuíam apenas três, mostrando o efeito da maturidade do carneiro sobre a diversidade das subpopulações espermáticas. A seleção de carneiros adultos (SF-S $>$ 18) melhorou os valores médios da maioria dos

parâmetros cinéticos avaliados. Além disso, o grupo SF-S>18 apresentou um maior número de subpopulações com a formação de quatro clusters. Deste modo, pode-se inferir que a seleção de carneiros adultos e aprovados em exame andrológico aumentou a heterogeneidade celular e melhorou a qualidade do sêmen fresco.

O ambiente é composto por diversos fatores estressores que interagem com toda a fisiologia animal, gerando diferentes respostas denominadas interação animal-ambiente [10,46,47]. Ao agrupar carneiros jovens, forma-se um grupo mais homogêneo quanto ao nível de exposição a condições ambientais e de manejo que afetam a fisiologia e conseqüentemente o potencial reprodutivo. Assim, animais mais jovens são, na maioria das vezes, menos expostos a variáveis externas em relação aos animais mais maduros. Desta forma, a maior diversidade ambiental a que os carneiros adultos foram expostos, pode ter refletido na heterogeneidade das suas subpopulações espermáticas. Além disso, o grupo de animais jovens utilizado neste trabalho é contemporâneo, oriundo de uma mesma geração, enquanto os animais mais maduros vieram de gerações diferentes, o que também pode ter refletido na maior heterogeneidade do grupo de carneiros adultos.

A conservação do sêmen foi ampliada nas últimas décadas para atender às grandes demandas das biotécnicas reprodutivas, contudo, acarreta diminuição na capacidade fertilizante dos espermatozoides por provocar importantes mudanças estruturais e em sua qualidade. Como esperado, os processamentos de conservação utilizados neste trabalho, representados pela refrigeração e a congelação, reduziram a proporção de espermatozoides móveis, dos valores médios dos parâmetros cinéticos e a quantidade de subpopulações e, conseqüentemente, a heterogeneidade espermática. Pôde-se perceber que as amostras de sêmen conservado foram compostas por duas subpopulações bem definidas, com a maior proporção de espermatozoides rápidos, lineares e progressivos (57,20% no sêmen refrigerado e 59,90% no congelado), com 83,58% e 82,93% de espermatozoides móveis no sêmen refrigerado e congelado, respectivamente.

A refrigeração do sêmen a 5°C diminui a atividade metabólica dos espermatozoides, permitindo o seu armazenamento antes da inseminação artificial [25]. Entretanto, a manipulação do sêmen durante o processo de conservação promove danos estruturais, bioquímicos e funcionais nos espermatozoides, reduzindo a sua viabilidade [48]. Já foi evidenciado que o aumento na duração do armazenamento do sêmen refrigerado, diminui a motilidade espermática [49], interferindo negativamente na taxa de concepção após a IA [50]. Dessa forma, os menores valores médios dos parâmetros avaliados do sêmen refrigerado (SR)

podem ser explicados pelo tempo de armazenamento das amostras entre 48 e 72 horas antes da sua avaliação, o que pode ter sido muito tempo, explicando o porquê das médias do sêmen refrigerado serem menores do que do sêmen congelado. No entanto, são necessários mais estudos que utilizem diferentes períodos de refrigeração, principalmente 24 horas de armazenamento, para verificar o efeito desse tipo de conservação sobre as subpopulações espermáticas.

Trabalhos demonstraram que a criopreservação do sêmen altera as diferentes subpopulações de espermatozoides móveis presentes inicialmente no sêmen fresco, e essas modificações podem afetar os parâmetros cinéticos e a distribuição dos espermatozoides de cada subpopulação [15,21,51,52]. Ledesma et al. [53] encontraram quatro subpopulações no sêmen congelado de ovinos. Contudo, no presente estudo, foi encontrada diminuição na heterogeneidade espermática no sêmen congelado em relação ao sêmen fresco, com a formação de apenas duas subpopulações.

Apesar da subpopulação de maior proporção de espermatozoides do sêmen congelado (cluster 1) ter obtido maiores valores para a maioria dos parâmetros cinéticos em comparação à subpopulação de maior proporção do sêmen fresco de carneiros selecionados (SF-S), deve-se considerar que o grupo de sêmen congelado apresentou menor porcentagem de células espermática móveis (82,93%) em relação ao sêmen fresco (91,78%).

A identificação das subpopulações espermáticas no sêmen de reprodutores é relevante para selecionar aqueles que possuam maior número e porcentagem de subpopulações superiores e, conseqüentemente, que possuam maior potencial de utilização no manejo reprodutivo e em processos de conservação seminal. O macho possui influência na distribuição das subpopulações de espermatozoides no sêmen, e essa variação pode ser oriunda de diferenças nas características morfológicas [54,55], motilidade e velocidade espermáticas [34,56]. Maroto-Morales et al. [13], trabalhando com morfometria espermática em ovino, relataram considerável variação individual entre os machos nas porcentagens de espermatozoides dentro de cada subpopulação. Os carneiros utilizados no nosso trabalho variaram entre si quanto à proporção das subpopulações independentemente do grupo. Além disso, nos grupos SF-T, SF-S e SF-S>18 foi observada uma variação entre os carneiros quanto ao número de subpopulações espermáticas, o que representa uma maior diversidade entre eles. Todos os carneiros dos grupos SF-S≤18, SR e SC apresentaram todas as subpopulações, refletindo menor heterogeneidade espermática entre eles. Novamente percebe-se que

carneiros com menor maturidade sexual e métodos de conservação do sêmen diminuem a diversidade espermática.

5. Conclusão

A seleção de carneiros por critérios andrológicos básicos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) não altera o número nem a proporção de subpopulações de espermatozoides com qualidade cinética, mantendo a heterogeneidade do sêmen fresco. A quantidade e as características cinéticas das subpopulações espermáticas no sêmen fresco de carneiros são influenciadas pela faixa etária dos animais. A seleção de carneiros adultos pode aumentar a qualidade cinética e o número de subpopulações espermáticas, aumentando a heterogeneidade do sêmen fresco. O sêmen fresco de carneiros mais jovens possui menor quantidade de subpopulações espermáticas (menor heterogeneidade) que aquele de carneiros adultos, mas mantém a mesma proporção de espermatozoides rápidos, lineares e progressivos.

A quantidade e as características cinéticas das subpopulações espermáticas de carneiros são influenciadas pelos métodos de conservação do sêmen. O número de subpopulações de espermatozoides móveis é menor em amostras seminais submetidas à refrigeração e congelamento em relação ao sêmen fresco. A conservação seminal diminui a proporção das subpopulações espermáticas consideradas rápidas, progressivas e lineares. Apesar do sêmen congelado apresentar subpopulação espermática com melhor qualidade cinética que aquelas do sêmen fresco, deve-se considerar que a proporção de espermatozoides móveis destas amostras é menor. O número e a proporção de espermatozoides das subpopulações variam entre carneiros, em especial nas amostras de sêmen fresco de animais adultos, com menor variação em amostras de sêmen de animais jovens e submetidas à conservação seminal.

6. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES - Código 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) e da Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (Fapitec/SE).

7. Referências

- [1] Mortimer ST. CASA-practical aspects. *J Androl* 2000; 21: 515–24.
- [2] Muiño R, Tamargo C, Hidalgo CO, Peña AI. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Anim Reprod Sci* 2008; 109: 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.10.007>.
- [3] Kanno C, Sakamoto KQ, Yanagawa Y, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M. Comparison of sperm subpopulation structures in first and second ejaculated semen from Japanese black bulls by a cluster analysis of sperm motility evaluated by a CASA system. *J Vet Med Sci* 2017; 79: 1359–65. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0012>.
- [4] Dorado J, Molina I, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology* 2010; 74: 795–804. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.004>.
- [5] Peña AI, Barrio M, Becerra JJ, Quintela LA, Herradón PG. Motile sperm subpopulations in frozen–thawed dog semen: Changes after incubation in capacitating conditions and relationship with sperm survival after osmotic stress. *Anim Reprod Sci* 2012; 133: 214–23. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.06.016>.
- [6] Quintero-Moreno A, Miró J, Teresa Rigau A, Rodríguez-Gil JE. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 2003; 59: 1973–90. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01297-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01297-9).
- [7] Dorado J, Acha D, Gálvez MJ, Ortiz I, Carrasco JJ, Díaz B, et al. Sperm motility patterns in Andalusian donkey (*Equus asinus*) semen: Effects of body weight, age, and semen quality. *Theriogenology* 2013; 79: 1100–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.006>.
- [8] Kanuga MK, Drew RE, Wilson-Leedy JG, Ingermann RL. Subpopulation distribution of motile sperm relative to activation medium in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). *Theriogenology* 2012; 77: 916–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.020>.
- [9] Gallego V, Cavalcante SS, Fujimoto RY, Carneiro PCF, Azevedo HC, Maria AN. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Theriogenology* 2017; 87: 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.001>.
- [10] Bravo JA, Montanero J, Calero R, Roy TJ. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. *Anim Reprod Sci* 2011; 129: 22–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.10.005>.
- [11] Martí JI, Aparicio IM, Leal CLV, García-Herreros M. Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality parameters in ram ejaculates. *Theriogenology* 2012; 78: 528–41. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.035>.
- [12] Abaigar T, Cano M, Pickard AR, Holt WV. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction* 2011; 122: 265–273. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220265>.
- [13] Maroto-Morales A, Ramón M, García-Álvarez O, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Roldan ERS, et al. Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in Ram ejaculates: intra- and interindividual variation.

- Theriogenology 2012; 77: 1529–39.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.020>.
- [14] Martí JI, Aparicio IM, García-Herreros M. Sperm morphometric subpopulations are differentially distributed in rams with different maturity age in cryopreserved ejaculates. *Theriogenology* 2011; 76: 97–109.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.022>.
- [15] Muiño R, Peña AI, Rodríguez A, Tamargo C, Hidalgo CO. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology* 2009; 72: 860–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.009>.
- [16] Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, del Barrio G. Sperm Subpopulations in Boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhorr*) Semen as Revealed by Pattern Analysis of Computer-Assisted Motility Assessments. *Biol Reprod* 1999; 60: 32–41.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod60.1.32>.
- [17] Vicente-Fiel S, Palacín I, Santolaria P, Yániz JL. A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). *Anim Reprod Sci* 2013; 139: 182–9.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.04.002>.
- [18] Harrison R. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 581–94. <https://doi.org/10.1071/RD9960581>.
- [19] Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod* 2000; 5: 46–52.
- [20] Amann R, Hammerstedt R, Veeramachaneni D. The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5: 361–81. <https://doi.org/10.1071/RD9930361>.
- [21] Flores E, Taberner E, Rivera MM, Peña A, Rigau T, Miró J, et al. Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. *Theriogenology* 2008; 70: 936–45.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.056>.
- [22] Santolaria P, Vicente-Fiel S, Palacín I, Fantova E, Blasco ME, Silvestre MA, et al. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Anim Reprod Sci* 2015; 163: 82–8.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.10.001>.
- [23] Martí JI, Aparicio IM, García-Herreros M. Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. *Theriogenology* 2011; 75: 473–81. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.015>.
- [24] Gonzalez C, Costa J. *Reprodução assistida e manejo de ovinos de corte*. 1st ed. Brasília: Embrapa; 2012.
- [25] Evans G, Maxwell W. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. 1st ed. Zaragoza: Acribia; 1990.
- [26] Souza A, Guerra M, Coletto Z, Mota R, Silva L, Leão A, et al. Avaliação microbiológica de sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2006; 43: 329–36. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26480>.
- [27] Bandeira AMP, Matos JE, Maria AN, Carneiro PCF, Purdy PH, Azevedo HC. The effects of gelatin supplementation prior to cooling on ram semen quality and fertility. *Anim Reprod* 2018; 15: 23–8. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2017-0021>.
- [28] Mandiki SNM, Derycke G, Bister JL, Paquay R. Influence of season and age on sexual maturation parameters of Texel, Suffolk and Ile-de-France rams 1. Testicular size, semen quality and reproductive capacity. *Small Rumin Res* 1998; 28: 67–79.
[https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(97\)00073-4](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(97)00073-4).

- [29] Henry M, Neves J, Jobim M. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 3rd ed. Belo Horizonte: CBRA; 2013.
- [30] McCune B, Grace JB. Analysis of ecological communities. Mjmm software. Glendeden Beach: Oregon; 2002.
- [31] Beirão J, Cabrita E, Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Herráez MP. Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. *Cryobiology* 2011; 62: 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.11.005>.
- [32] Martínez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L, de Paz P. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology* 2011; 75: 783–95. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.034>.
- [33] Meseguer M, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Relationship Between Standard Semen Parameters, Calcium, Cholesterol Contents, and Mitochondrial Activity in Ejaculated Spermatozoa From Fertile and Infertile Males. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 445–51. <https://doi.org/10.1007/s10815-004-8761-7>.
- [34] Martínez-Pastor F, García-Macias V, Alvarez M, Herráez P, Anel L, de Paz P. Sperm Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm and Their Changes Through the Cryopreservation Process. *Biol Reprod* 2005; 72: 316–27. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.032730>.
- [35] Broekhuyse MLWJ, Sostaric E, Feitsma H, Gadella BM. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J Anim Sci* 2012; 90: 779–89. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4311>.
- [36] Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Sánchez-Nadal JA, Santolaria P. Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Anim Reprod Sci* 2015; 156: 128–34. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.03.012>.
- [37] Petrunkina AM, Waberski D, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 2007; 134: 3–17. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0046>.
- [38] Luna C, Yeste M, Rivera del Alamo MM, Domingo J, Casao A, Rodríguez-Gil JE, et al. Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations in ram ejaculates. *Reprod Fertil Dev* 2015; 29. <https://doi.org/10.1071/RD15231>.
- [39] Gillan L, Kroetsch T, Chis Maxwell WM, Evans G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim Reprod Sci* 2008; 103: 201–14. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.12.010>.
- [40] Hafez E. Transporte e sobrevivência de gametas. In: Hafez ESE, Hafez B. *Reprodução Animal*. 6th ed. São Paulo: Manole; 1995.
- [41] Malo AF, Garde JJ, Soler AJ, García AJ, Gomendio M, Roldan ERS. Male Fertility in Natural Populations of Red Deer is Determined by Sperm Velocity and the Proportion of Normal Spermatozoa. *Biol Reprod* 2005; 72: 822–9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036368>.
- [42] Del Olmo E, Bisbal A, Maroto-Morales A, García-Alvarez O, Ramon M, Jimenez-Rabadan P, et al. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Anim Reprod Sci* 2013; 138: 102–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.007>.
- [43] Dulaimi MKHAL, Tapaloaga D, Tapaloaga P-R, Petcu CD. Results Regarding Some Morphometric Features of Spermatozoa in Ram. *Agric Agric Sci Procedia* 2015; 6: 232–5. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.064>.
- [44] Chenoweth PJ, Lorton S. *Animal Andrology: Theories and Applications*. Wallingford: CABI; 2014.

- [45] Benia AR, Saadi MA, Ait-Amrane A, Belhamiti TB, Selles SMA, Kaidi R. Effect of season and age on main characteristics of sperm production in the Ouled-Djellal rams. *Livest Res Rural Dev* 2018; 30: 15.
- [46] Müller P. *Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos*. 3rd ed. Porto Alegre: Sulina; 1989.
- [47] Neiva JNM, Teixeira M, Turco HN, Oliveira SMP de, Moura A de AAN. Efeito do estresse climático sobre os parâmetros produtivos e fisiológicos de ovinos Santa Inês mantidos em confinamento na região litorânea do Nordeste do Brasil. *Rev Bras Zootec* 2004; 33: 668–78. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000300015>.
- [48] Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 77–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X).
- [49] Câmara DR, Silva SV, Almeida FC, Nunes JF, Guerra MMP. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology* 2011; 76: 342–50. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.013>.
- [50] O’Hara L, Hanrahan JP, Richardson L, Donovan A, Fair S, Evans ACO, et al. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology* 2010; 73: 541–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.009>.
- [51] Cremades T. Kinematic Changes During the Cryopreservation of Boar Spermatozoa. *J Androl* 2005; 26: 610–8. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05028>.
- [52] Barbas JP, Leahy T, Horta AE, García-Herreros M. Sperm kinematics and subpopulational responses during the cryopreservation process in caprine ejaculates. *Cryobiology* 2018; 82: 137–47. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.03.005>.
- [53] Ledesma A, Zalazar L, Fernández-Alegre E, Hozbor F, Cesari A, Martínez-Pastor F. Seminal plasma proteins modify the distribution of sperm subpopulations in cryopreserved semen of rams with lesser fertility. *Anim Reprod Sci* 2017; 184: 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.06.015>.
- [54] Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl* 2001; 22: 382–94.
- [55] Ramón M, Pérez-Guzmán MD, Jiménez-Rabadán P, Estes MC, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, et al. Sperm cell population dynamics in ram semen during the cryopreservation process. *PLoS ONE* 2013; 8: e59189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059189>.
- [56] Ramón M, Martínez-Pastor F, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Soler AJ, Jiménez-Rabadán P, et al. Taking advantage of the use of supervised learning methods for characterization of sperm population structure related with freezability in the Iberian red deer. *Theriogenology* 2012; 77: 1661–72. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.011>.

ANEXOS

Tabela 1

Parâmetros cinéticos de espermatozoides móveis no sêmen fresco de carneiros Santa Inês submetidos a critérios de seleção etária e andrológica e a diferentes métodos de conservação seminal. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Grupos	Parâmetros cinéticos							
	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)	WOB (%)
SF-T	272,29 \pm 101,01 ^b	114,93 \pm 62,27 ^b	156,07 \pm 60,44 ^b	40,33 \pm 17,98 ^b	68,66 \pm 26,03 ^a	3,41 \pm 1,13 ^b	38,71 \pm 16,65 ^b	56,76 \pm 10,29 ^b
SF-S	267,30 \pm 102,02 ^c	112,56 \pm 61,65 ^c	152,64 \pm 60,94 ^c	40,00 \pm 17,97 ^{bc}	68,50 \pm 26,25 ^{ab}	3,38 \pm 1,15 ^c	38,07 \pm 16,70 ^c	56,33 \pm 10,58 ^c
SF-S \leq 18	226,78 \pm 99,95 ^d	99,22 \pm 59,27 ^d	130,28 \pm 61,73 ^e	39,62 \pm 19,30 ^c	68,00 \pm 28,42 ^b	2,98 \pm 1,15 ^d	34,80 \pm 17,88 ^d	55,20 \pm 13,07 ^c
SF-S $>$ 18	280,89 \pm 99,62 ^a	117,03 \pm 61,78 ^a	160,14 \pm 58,80 ^a	40,13 \pm 17,50 ^b	68,65 \pm 25,48 ^a	3,52 \pm 1,11 ^a	39,19 \pm 16,13 ^a	56,71 \pm 9,58 ^c
SR	153,69 \pm 91,46 ^f	59,16 \pm 47,48 ^e	82,03 \pm 51,93 ^f	32,96 \pm 18,51 ^d	61,23 \pm 27,07 ^d	2,35 \pm 1,19 ^e	21,22 \pm 15,99 ^f	51,15 \pm 15,05 ^d
SC	202,29 \pm 137,48 ^e	107,56 \pm 104,47 ^d	137,01 \pm 111,11 ^d	41,53 \pm 26,28 ^a	62,98 \pm 30,85 ^c	2,24 \pm 1,18 ^f	31,34 \pm 22,60 ^e	60,64 \pm 18,79 ^a

SF-T: sêmen fresco sem seleção; SF-S: sêmen fresco de carneiros selecionados por critérios andrológicos; SF-S \leq 18: sêmen fresco de carneiros contemporâneos e jovens selecionados por critérios andrológicos; SF-S $>$ 18: sêmen fresco de carneiros não contemporâneos e adultos selecionados por critérios andrológicos; SR: sêmen refrigerado; SC: sêmen congelado. VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade em linha reta; VAP: velocidade do percurso médio; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência do batimento flagelar cruzado; WOB: índice de oscilação. Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05).

Tabela 2

Caracterização das subpopulações de espermatozoides móveis obtidas pela análise cinética espermática computadorizada (CASA) do sêmen de carneiros Santa Inês submetidos a critérios de seleção etária e andrológica e a diferentes métodos de conservação seminal. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Grupo	Cluster	Parâmetros cinéticos							
		VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)	WOB (%)
SF-T	1	304,32 \pm 73,37 ^d	138,94 \pm 47,12 ^b	179,63 \pm 39,16 ^d	46,67 \pm 13,73 ^d	77,43 \pm 18,72 ^d	3,71 \pm 0,88 ^d	45,46 \pm 11,34 ^c	59,85 \pm 7,42 ^c
	2	308,13 \pm 77,06 ^c	132,56 \pm 47,90 ^d	177,10 \pm 39,63 ^f	44,13 \pm 14,16 ^{efg}	74,84 \pm 19,63 ^e	3,81 \pm 0,93 ^c	43,57 \pm 11,94 ^e	58,41 \pm 7,72 ^f
	3	126,77 \pm 62,58 ^h	22,95 \pm 21,08 ⁱ	58,93 \pm 33,48 ^k	17,59 \pm 15,48 ^j	35,71 \pm 26,12 ⁱ	1,95 \pm 0,82 ^j	13,04 \pm 8,90 ⁱ	46,09 \pm 13,23 ^j
SF-S	1	310,26 \pm 74,43 ^b	133,78 \pm 48,28 ^c	178,42 \pm 39,61 ^e	44,05 \pm 13,98 ^g	74,92 \pm 19,63 ^e	3,86 \pm 0,91 ^b	43,42 \pm 11,70 ^e	58,28 \pm 7,42 ^f
	2	286,61 \pm 77,42 ^c	130,40 \pm 46,72 ^e	168,57 \pm 41,56 ^g	46,55 \pm 13,55 ^d	77,42 \pm 18,47 ^d	3,55 \pm 0,86 ^f	44,00 \pm 11,88 ^d	59,70 \pm 7,60 ^{cde}
	3	112,44 \pm 58,41 ^j	17,21 \pm 17,10 ^j	49,86 \pm 30,07 ^l	14,69 \pm 13,70 ^l	31,30 \pm 24,61 ^l	1,78 \pm 0,78 ^k	10,88 \pm 8,01 ^j	43,64 \pm 13,65 ^l
SF-S \leq 18	1	267,61 \pm 67,70 ^g	124,06 \pm 40,71 ^f	157,36 \pm 37,08 ⁱ	47,30 \pm 12,49 ^c	79,01 \pm 16,95 ^c	3,44 \pm 0,80 ^g	42,53 \pm 11,13 ^f	59,56 \pm 7,35 ^{de}
	2	83,17 \pm 50,26 ^k	11,84 \pm 15,42 ^m	35,06 \pm 27,09 ^{mn}	12,58 \pm 13,98 ^m	28,18 \pm 25,81 ^m	1,39 \pm 0,70 ^l	7,58 \pm 7,63 ^k	39,83 \pm 16,71 ⁿ
SF-S $>$ 18	1	319,89 \pm 75,97 ^a	154,30 \pm 44,21 ^a	191,60 \pm 37,46 ^b	49,31 \pm 12,30 ^b	80,54 \pm 15,89 ^b	3,74 \pm 0,86 ^d	49,01 \pm 10,55 ^a	60,92 \pm 7,19 ^b
	2	320,06 \pm 71,04 ^a	132,89 \pm 48,64 ^{cd}	181,46 \pm 38,22 ^c	42,31 \pm 13,90 ^h	73,16 \pm 20,31 ^f	4,00 \pm 0,88 ^a	42,64 \pm 11,67 ^f	57,33 \pm 7,09 ^{ghi}
	3	286,82 \pm 76,20 ^e	113,92 \pm 46,39 ^g	162,28 \pm 39,50 ^h	41,08 \pm 15,09 ⁱ	70,67 \pm 21,85 ^g	3,70 \pm 0,95 ^e	39,81 \pm 11,64 ^g	57,55 \pm 7,92 ^g
	4	127,06 \pm 56,55 ^h	21,31 \pm 19,03 ⁱ	57,95 \pm 29,4 ^k	16,69 \pm 14,4 ^k	34,16 \pm 24,76 ^j	1,97 \pm 0,74 ^j	12,87 \pm 8,15 ⁱ	45,98 \pm 11,76 ^{jk}
SR	1	214,64 \pm 7,83 ⁱ	93,61 \pm 32,40 ^h	119,60 \pm 2,53 ^j	44,98 \pm 11,75 ^{ef}	77,97 \pm 14,01 ^d	3,10 \pm 0,94 ^h	31,93 \pm 12,09 ^h	57,33 \pm 9,24 ^{hi}
	2	72,10 \pm 42,10 ^l	13,04 \pm 12,24 ^k	31,73 \pm 21,70 ^{no}	17,00 \pm 13,00 ^j	38,30 \pm 23,62 ^h	1,35 \pm 0,60 ^m	6,89 \pm 6,61 ^m	42,89 \pm 17,20 ^m
SC	1	291,48 \pm 101,36 ^f	171,57 \pm 88,68 ^a	206,55 \pm 89,55 ^a	58,76 \pm 17,21 ^a	82,63 \pm 16,65 ^a	2,94 \pm 0,92 ⁱ	47,62 \pm 12,26 ^b	70,57 \pm 12,20 ^a
	2	69,16 \pm 46,72 ^m	12,00 \pm 14,75 ^l	33,20 \pm 28,47 ⁿ	15,80 \pm 13,24 ^k	33,24 \pm 22,46 ^k	1,20 \pm 0,60 ⁿ	7,03 \pm 7,86 ^l	45,81 \pm 17,05 ^k

SF-T: sêmen fresco sem seleção; SF-S: sêmen fresco de carneiros selecionados por critérios andrológicos; SF-S \leq 18: sêmen fresco de carneiros contemporâneos e jovens selecionados por critérios andrológicos; SF-S $>$ 18: sêmen fresco de carneiros não contemporâneos e adultos selecionados por critérios andrológicos; SR: sêmen refrigerado; SC: sêmen congelado. VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade em linha reta; VAP: velocidade do percurso médio; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência do batimento flagelar cruzado; WOB: índice de oscilação. Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05).

Tabela 3

Proporção de subpopulações (cluster) de espermatozoides móveis no sêmen de carneiros Santa Inês submetidos a critérios de seleção etária e andrológica e a diferentes métodos de conservação seminal.

Subpopulação de espermatozoides (sptz)	Grupo					
	SF-T % (n sptz)	SF-S % (n sptz)	SF-S \leq 18 % (n sptz)	SF-S $>$ 18 % (n sptz)	SR % (n sptz)	SC % (n sptz)
Cluster 1	46,40 (64.372)	44,20 (30.620)	77,90 (13.563)	31,20 (16.214)	57,20 (8.481)	59,90 (27.240)
Cluster 2	34,80 (48.211)	38,70 (26.872)	22,10 (3.856)	27,00 (14.031)	42,80 (6.335)	40,10 (18.248)
Cluster 3	18,80 (26.043)	17,10 (11.846)	-	26,00 (13.473)	-	-
Cluster 4	-	-	-	15,80 (8.201)	-	-
Total	100 (138.626)	100 (69.338)	100 (17.419)	100 (51.919)	100 (14.816)	100 (45.488)

SF-T: sêmen fresco sem seleção; SF-S: sêmen fresco de carneiros selecionados por critérios andrológicos; SF-S \leq 18: sêmen fresco de carneiros contemporâneos e jovens selecionados por critérios andrológicos; SF-S $>$ 18: sêmen fresco de carneiros não contemporâneos e adultos selecionados por critérios andrológicos; SR: sêmen refrigerado; SC: sêmen congelado. n sptz: Número de espermatozoides.

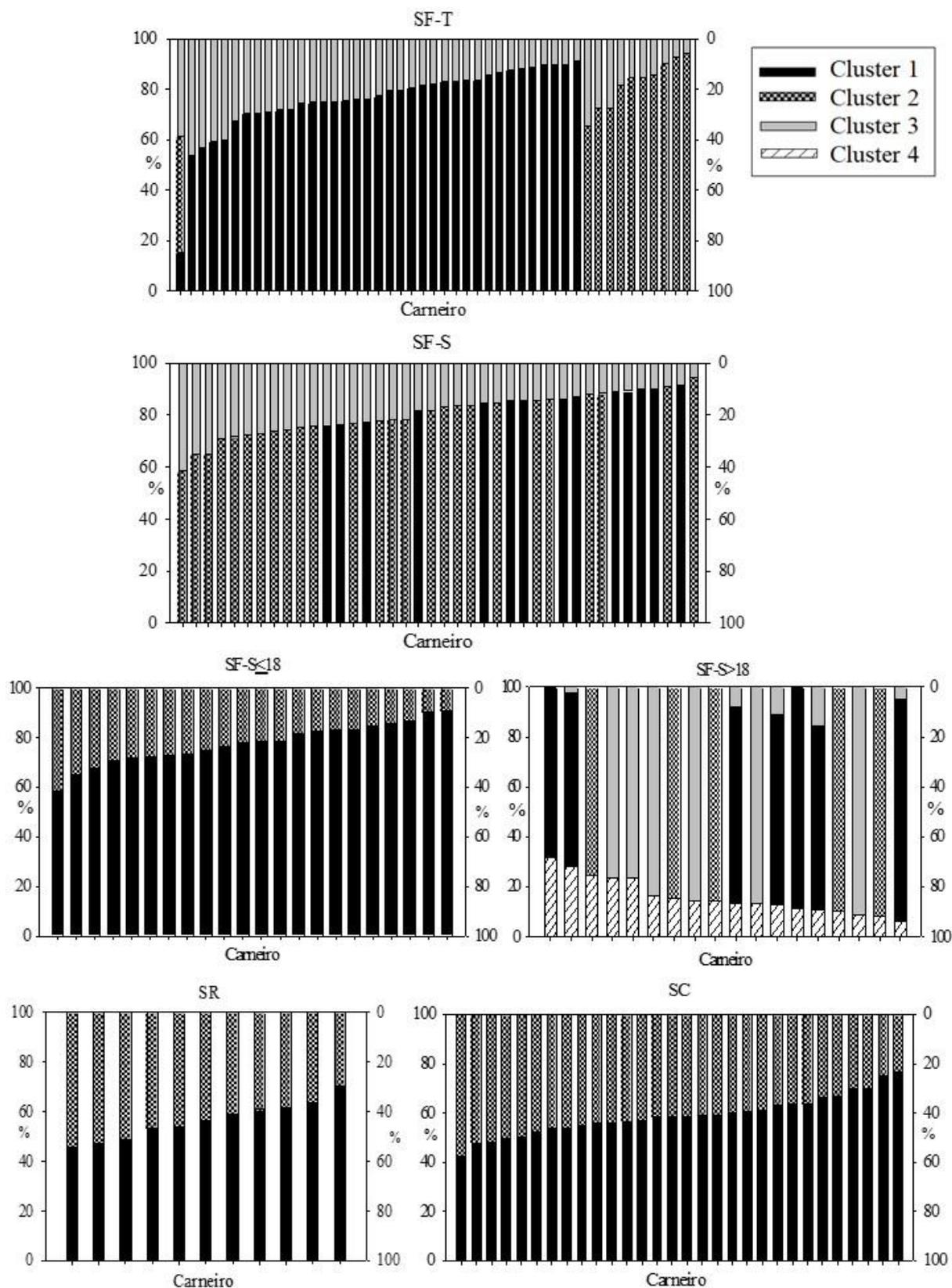


Figura 1. Distribuição das subpopulações de espermatozoides móveis obtidas pela análise cinética espermática computadorizada (CASA) no sêmen fresco de carneiros sem seleção (SF-T), selecionados por critérios andrológicos (SF-S), de jovens (SF-S \leq 18) e adultos (SF-S $>$ 18) selecionados por critérios andrológicos, e no sêmen refrigerado (SR) e congelado (SC).