

Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**Variabilidade das sub-populações de espermatozóides avaliadas
pela cinética em sistema computadorizado e
combinação de sondas fluorescentes como
parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos**

Daniel Bartoli de Sousa

Botucatu – SP
Janeiro 2007

Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**Variabilidade das sub-populações de espermatozóides avaliadas
pela cinética em sistema computadorizado e
combinação de sondas fluorescentes como
parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos**

Daniel Bartoli de Sousa

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Doutor em
Reprodução Animal

Orientador: Prof. Adj. Dr. Sony Dimas Bicudo

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Selma Maria de Jesus*

Sousa, Daniel Bartoli de.

Variabilidade das sub-populações de espermatozóides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos / Daniel Bartoli de Sousa. – 2007.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: Sony Dimas Bicudo

Assunto CAPES: 50504002

1. Ovino - Reprodução 2. Sêmen - Criopreservação

CDD 636.308245

Palavras-chave: Análise computadorizada do movimento espermático (CASA); Atividade mitocondrial; Criopreservação do sêmen ovino; Sondas fluorescentes; Sub-população espermática

"Se queremos progredir,
não devemos repetir a história,
mas fazer uma história nova."

Gandhi

Em especial a José Souza Santos.

"A mesma vida da qual originalmente nos é legada uma fração, um certo dia se vai, foge de nosso convívio, por um processo do qual a ciência não conhece sequer os rudimentos. De sua existência resta comigo o exemplo, a saudade imensa, o eterno agradecimento, além do pesar por não poder abraçá-lo agora e partilharmos juntos da alegria da tarefa cumprida." – Autor desconhecido

É dessa forma que me lembro:

*Naquela mesa ele sentava sempre
E me dizia sempre
O que é viver melhor.
Naquela mesa ele contava histórias
Que hoje na memória
eu guardo e sei de cor.
Naquela mesa ele juntava gente
E contava contente
O que fez de manhã...
E nos seus olhos era tanto brilho
Que mais que seu filho
Eu fiquei seu fã.
Eu não sabia que doía tanto
Uma mesa num canto
Uma casa e um jardim.
Se eu soubesse quanto dói a vida
Essa dor tão doída
Não doía assim.
Agora resta uma mesa na sala
E hoje ninguém mais fala
No seu bandolim...
Naquela mesa tá faltando ele
E a saudade dele
Tá doendo em mim.*

NAQUELA MESA - poema-música de Sérgio Bittencourt

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família:

- ♣ À minha amada mãe **Leonice Bartoli (Nice)** por acreditar sempre na minha capacidade, demonstrar paciência durante a minha impaciência e apoiar-me durante os momentos difíceis desta trajetória.

*"A moral
se edifica com
o bom exemplo,
não com palavras."*

Do livro Curso de Iniciação Logosófica

Δ Ao meu querido irmão **Danilo Bartoli de Sousa (Nilo)**, por todo amor, incentivo e, principalmente, exemplo de que somos capazes de fazer as coisas acontecerem.

*Nem sei o que dizer
Se só você que me faz querer
Viver mais e mais
Deixar tudo de ruim prá trás
Me fazendo melhorar
Meu companheiro, meu orgulho
Fazemos juntos muito barulho
Brigas fazem parte
Mas não passam de mais uma arte
Que fazemos juntos ...
Às vezes magoamos nosso herói
Sabemos como dói
E então, tentamos consertar
Voltado sempre a nos amar...
Agradeço sempre à Deus
O presente de te ter
Na minha vida, pra viver
Todos os dias ao teu lado
Meu irmãozinho amado,
Te guardo no meu coração
Pois és minha metade...
És meu irmão...
Minha Metade ... Meu Irmão*

♥ A minha futura esposa **Raphaella Barbosa Meirelles** pelo apoio e, principalmente, paciência e compreensão durante a finalização dessa tese.

DESDE QUE LLEGASTE
NO ME QUEMA EL FRIO
ME HIERVE LA SANGRE
OIGOS MIS LATIDOS

DESDE QUE LLEGASTE
SER FELIZ ES MI VICIO
CONTEMPLAR LA LUNA
MI MEJOR OFICIO
YO TE PROMETO AMOR ETERNO
POR QUE YO PUEDO
SOY TRIPULANTE DE UNA NUVEN
Y AVENTURERO
UN CAZADOR DE MARIPOSA
CUANDO TE VEO
Y RESUMIDO EN TRES PALABRAS
CUANTO TE QUIERO

DESDE QUE LLEGASTE
NADA ESTA PROHIBIDO
SE MARCHO LA DUDA
ME ABRAZÓ EL SUSPIRO

DESDE QUE LLEGASTE
NO HA Y MEJOR MOTIVO
PARA DESPERTARME PARA
SENTIRME VIVO

DESDE QUE LLEGASTE (adaptado)- Elefante

AGRADECIMENTOS

⇒ Ao mestre, orientador, e principalmente, grande amigo, **Prof. Adj. Dr. Sony Dimas Bicudo** que, desde o meu início como acadêmico de iniciação científica (abril de 1995), investiu em mim tempo, conhecimento, confiança, e hoje tem fundamental participação nesta formação profissional.

“Não basta ensinar ao homem apenas uma especialidade.

Por que se tornará uma máquina utilizável

e não uma personalidade.

É necessário que adquira um sentimento,

um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido,

daquilo que é belo,

do que é moralmente correto”.

Albert Einstein

- À **Família Meirelles** por toda ajuda e apoio durante os últimos meses de execução desse trabalho
- Aos docentes deste departamento: professoras **Eunice Oba, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga e Maria Denise Lopes**, e aos professores **Cezinande de Meira, Frederico Ozanan Papa, João Pinheiro Ferreira e Marco Antonio Alvarenga**, pelos ensinamentos, incentivos e confiança durante minha fase de formação e, em especial, ao amigo **Nereu Carlos Prestes** por sempre ter confiado na minha vontade de ser grande. Valeu Nereu!
- Aos companheiros e amigos de pós-graduação **Hymerson Costa de Azevedo, Marciane Maia, Leandro Rodello e Carmen Cecília Sicherle** pelas horas de conversa e grande apoio durante a realização dessa tese.
- A amiga de pós-graduação **Carmen Cecília Sicherle** e seu marido **Francesco Sicherle**; ao professor **Carlos Roberto Teixeira**; ao senhor **José de Oliveira Prado**; ao Médico Veterinário **Danilo Ferreira**; ao senhor **André Camargo Assumpção** e ao senhor **Hélio Duarte** por gentilmente terem cedido animais para a realização do experimento.
- Aos amigos e funcionários do serviço de Reprodução Animal **José Maria Pimentel (Tico), Márcio José Figueira, Marcos Antonio Fumis Pellici, Maria Cristina Paganini L. Rosa, Miguel Alves da Silva e Valter Osvaldo Fabris**, que desde meu ingresso na Universidade sempre me ajudaram e incentivaram. E em especial, ao grande amigo **Edílson de Souza Freire**.

- Aos senhores **Halim Atique Netto**, diretor do Hospital Veterinário Dr. Halim Atique, e **Alan Perez Ferraz de Melo**, coordenador do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Rio Preto – SP e a senhora **Tabata Salum Calile Atique** pela colaboração durante a realização desse sonho.
- A empresa **TK Tecnologia em Congelação Ltda**, no nome do senhor **Carlos Carvalho Motta** que gentilmente cedeu a máquina de congelação, facilitando a realização deste experimento.
- Prof. Dr. **Antonio José Manzato**, Depto de Ciências da Computação e Estatística, IBILCE, Unesp, São José do Rio Preto pela imensa ajuda na avaliação dos dados dessa tese.
- E a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a execução desta tese e, possam não constar nesses agradecimentos.

CONFÚCIO E OS PROFESSORES

Pouco se conhece a respeito da vida do filósofo chinês Confúcio; acredita-se que viveu entre 551-479 A.C. Algumas de suas obras são atribuídas a ele, outras foram compiladas por seus discípulos. Em um destes textos, "Conversas Familiares", existe um interessante diálogo a respeito do aprendizado:

Confúcio sentou-se para descansar, e logo os alunos começaram a fazer perguntas. Naquele dia, o Mestre estava bem disposto, e resolveu responder.

- O Sr. consegue explicar tudo o que sente. Por que não vai até o imperador e fala com ele?

- O imperador também faz belos discursos - disse Confúcio. - E belos discursos são apenas uma questão de técnica; eles não trazem em si a Virtude.

- Então envie o seu livro Poemas.

- Os trezentos poemas ali escritos podem ser resumidos numa só frase: pense corretamente. Este é o segredo.

- O que é pensar corretamente?

- É saber usar a mente e o coração, a disciplina e a emoção. Quando se deseja uma coisa, a vida nos guiará até lá, mas por caminhos que não esperamos. Muitas vezes, nos deixamos confundir, porque estes caminhos nos surpreendem - e então achamos que estamos indo na direção errada. Por isso eu disse: deixe-se levar pela emoção, mas tenha a disciplina de seguir adiante.

- O Sr. faz isso?

- Aos quinze anos, comecei a aprender. Aos trinta, passei a ter certeza do que desejava. Aos quarenta, as dúvidas voltaram. Aos cinquenta anos, descobri que o Céu tem um projeto para mim e para cada homem sobre a face da Terra. Aos sessenta, compreendi este projeto e encontrei a tranquilidade para segui-lo. Agora, aos setenta anos, posso escutar meu coração, sem que ele me faça sair do caminho.

- Então, o que o faz diferente dos outros homens que também aceitam a vontade do Céu?

- Eu procuro dividi-la com vocês. E quem consegue discutir uma verdade antiga com uma geração nova, deve usar sua capacidade ensinar. Esta é a minha única qualidade: ser um bom professor.

- O que é um bom professor?

- O que examina tudo o que ensina. As idéias antigas não podem escravizar o homem, porque elas se adaptam, e ganham novas formas. Então, tomemos a riqueza filosófica do passado, sem esquecer os desafios que o mundo presente nos propõe.

- O que é um bom aluno?

- Aquele que escuta o que eu digo, mas adapta meus ensinamentos à sua vida, e nunca os segue ao pé da letra. Aquele que não procura um emprego, mas um trabalho que o dignifica. Aquele que não busca ser notado, e sim fazer algo notável.

RESUMO

SOUSA, D. B. Variabilidade das sub-populações de espermatozóides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos. Botucatu, 2007. 123p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Várias pesquisas foram desenvolvidas visando a melhoria da congelabilidade do sêmen ovino. Contudo, ainda não houve progressos significativos na fertilidade do sêmen congelado após a inseminação artificial cervical. Diversos sistemas de análise computadorizada do movimento espermático (CASA) têm sido propostos e aplicados na tentativa de quantificar características específicas do movimento espermático, podendo ainda determinar a presença e a cinética das sub-populações de espermatozóides. Muitos testes para avaliar a função espermática foram desenvolvidos, permitindo analisar simultaneamente diferentes aspectos da função espermática. Análise da função mitocondrial oferece uma maneira de acessar a motilidade espermática. Foram objetivos otimizar o sistema CASA na avaliação do sêmen congelado; determinar parâmetros da cinética espermática que expressem analogia com as características da avaliação das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (IP, FITC-PSA e JC-1; MITO; R-123) e utilizar conjuntamente os parâmetros fornecidos pelo sistema CASA e pelas sondas fluorescentes para agrupar as amostras de maneira qualitativa. Vinte e seis amostras de sêmen congelado de diferentes carneiros foram estudadas pelo CASA obtendo-se para os parâmetros VCL, VAP, VSL, ALH, BCF, LIN, STR, ELONG dados médios e individuais para cada espermatozóide e por sondas fluorescentes para a avaliação simultânea da integridade de membrana plasmática, reação acrossomal e potencial de membrana mitocondrial. Estatisticamente aplicou-se a análise exploratória de técnicas multivariadas obtendo-se três fatoriais sendo o primeiro fator F1 positivo e alto para as variáveis VAP, VSL, STR e LIN, que é interpretado com um fator relacionado à

progressividade. Para o segundo fator F2, associam as variáveis VCL, ALH e MT, que representam um fator de deslocamento. Para o terceiro fator F3 estão associados as variáveis BCF, MITO e ELONG, cuja interpretação diz respeito à energia disponível. Obteve-se a formação 9 grupos distintos A, B, C, D, E, F, G, H, e I. O sêmen congelado dos carneiros 2, 4 e 13 é muito diferente do restante dos animais, formando grupos unitários. Para a amostra do animal número 2 (grupo C), encontrou-se valores baixos nos três fatores. No material dos animais 4 (grupo G) e 13 (grupo H) encontrou-se valores baixos em progressividade do movimento e disponibilidade de energia, porém apresentam bom deslocamento. Para os carneiros 1 e 8 (grupo A), observou-se os melhores valores de energia porém fraco em progressividade e mediano em deslocamento. No grupo constituído pelos animais 11, 19, 25, 15 e 21 (grupo B), bons valores de progressividade e valores de mediano para baixo em deslocamento e disponibilidade de energia. Para o grupo formado pelos carneiros 6, 9, 7 e 16 (grupo D) verificam-se baixos valores em energia disponível e progressividade e valores medianos em deslocamento espermático. O grupo dos animais 14, 20 e 26 (grupo E) apresenta baixos valores de energia disponível e deslocamento, sendo o carneiro 14 fraco em direção, e os demais animais com valores medianos para progressividade. O grupo dos animais 3, 22, 5, 10 e 12 (grupo F) apresenta altos valores de progressividade e deslocamento porém apresenta valores ruins em disponibilidade de energia. O grupo dos animais 17, 24, 18 e 23 (grupo I) apresenta em seu material alto valor para progressividade, de mediano para baixo em deslocamento e fracos em energia disponível. A análise computadorizada do movimento espermático (CASA) no sêmen congelado de ovinos fornece informações necessárias ao entendimento da cinética das sub-populações, possibilitando que centenas de células sejam avaliadas durante um procedimento de rotina, ampliando os horizontes do conhecimento da biotecnologia da criopreservação do sêmen ovino.

Palavras chave: sub-população espermática; criopreservação do sêmen ovino; análise computadorizada do movimento espermático (CASA); atividade mitocondrial; sondas fluorescentes.

ABSTRACT

SOUSA, D. B. **Evaluation of sperm sub-populations variability by computer assessment of kinematics motion together with fluorescent probes in determination of qualitative aspects of ram frozen semen.** Botucatu, 2007. 123p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Many researches were developed to improve the ram semen criopreservation. However, no significant advances in the fertility rates with the frozen semen were observed with cervical artificial insemination. Several computer-assisted motility assessments (CASA) systems have been considered and applied in the attempt to quantify specific characteristics of the sperm motion and still them being able to determine the spermatozoa presence and subpopulations kinematics. A large number of sperm functions evaluation had been developed, making it possible to analyze different aspects of the sperm function simultaneously. Analysis of the mitochondrial function offers a way to have access the sperm motility. The aim of this study was to optimize the CASA system in the evaluation of the ram frozen semen; determine parameters of the sperm kinematics that express analogy with the characteristics of the evaluation of plasmatic, acrossomal and mitochondrial membranes (PI, FITC-PSA and JC-1; MITO; R-123) and use CASA parameters together with the fluorescent probes to group samples in a qualitative way. Twenty and six frozen semen samples of different rams were evaluated by CASA system for mean and individual sperm motion parameters VCL, VAP, VSL, ALH, BCF, LIN, STR, ELONG and for fluorescent probes leads for the simultaneous evaluation of the integrity of plasmatic, acrossomal membranes and membrane mitochondrial potential. The statistic applied was multivariate analysis getting to three different factorials. The first factor was positive and high (F1 factor) for variables VAP, VSL, STR and LIN, that were interpreted with the forward displacement. For F2 factor, there were associate variables VCL, ALH and MT that represent the displacement. The F3 factor, whose interpretation has to do with available energy, was

associated with variables BCF, MITO and ELONG. Nine distinct groups A, B, C, D, F, G, H, and I were formed. The ram frozen semen 2, 4 and 13 were very different forming unitary groups. For the sample number 2 (group C), it was noticed low values in the three factors. In the sample of animals 4 (group G) and 13 (group H) low values in forward progression and available energy were found, however with good displacement. For ram 1 and 8 (group A) it was observed the best energy values however it was weak in forwarding progressively and medium for displacement. In the group 11, 19, 25, 15 and 21 (group B), good values of forward motion and medium-low values in displacement and availability of energy were observed. For the group formed for ram 6, 9, 7 and 16 (group D) it could be verified low values in available energy, medium to forward progressively and displacement. The group of animals 14, 20 and 26 (group E) presented low values of energy and displacement, with weak direction for ram 14 and those ones with medium values for forward displacement. The group 3, 22, 5, 10 and 12 (group F) presented high values of progressive and displacement however low values for energy. The group of animals 17, 24, 18 and 23 (group I) offered high values for forward movement, medium-low to displacement and weak to available energy. The computer-assisted motility assessments (CASA) for the ram frozen semen supplies information necessary to understand the sperm subpopulations kinematics, making possible evaluation of hundreds cells during a routine procedure and widen the knowledge of the criopreservation of the ram semen.

Key Words: sperm subpopulation; criopreservation of ram semen; computer-assisted semen motility analysis (CASA); mitochondrial activity; fluorescents probes.

Lista de Figuras

- FIGURA 1: Dendrograma, representação gráfica do processo de agrupamento hierárquico de 26 amostras de sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês, baseado na variabilidade, com valor de similaridade máxima igual a 100,00. 97
- FIGURA 2: Gráfico representativo de 26 amostras de sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês, baseado na variabilidade, dado pelos escores fatoriais rotacionados F1 rot (variáveis VAP, VSL, STR e LIN), F2 rot (variáveis VCL, ALH e MT) e F3 rot (variáveis BCF, MITO e ELONG). 99
- FIGURA 3: Disposição de 26 amostras de sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês, baseada na variabilidade, no plano bidimensional considerando os fatores rotacionados F1 (variáveis VAP, VSL, STR e LIN) e F2 (variáveis VCL, ALH e MT). 103

Lista de Tabelas

- TABELA 1: Valores médios $\pm$ dp e amplitude de variação dos parâmetros do sêmen *in natura*, clarificado no meio X-Cell[®], de ovinos da raça Santa Inês utilizados para a congelação (n=26)..... 75
- TABELA 2: Valores médios, desvios padrão e amplitude de variação dos parâmetros da cinética espermática avaliadas no sistema computadorizado de análise do movimento espermático CASA – HTM-IVOS (versão 12,3) das amostras (n=26) de sêmen de ovinos congelado/descongelado no meio Glicina Gema Leite e clarificados no meio X-Cell[®] 76
- TABELA 3: Desvios padrão dos parâmetros da cinética espermática do sêmen congelado de 26 carneiros da raça Santa Inês determinados em três campos de análise pelo Sistema de Análise Computadorizada do Movimento Espermático – CASA HTM-IVOS versão 12.3 80
- TABELA 4: Frequências (%) quantitativa e qualitativa da distribuição por categorias dos espermatozóides de 26 carneiros da raça Santa Inês após o processo de congelação/descongelação avaliados em microscopia epifluorescente por diferentes combinações de sondas fluorescentes: IP (iodeto de propídeo); FITC-PSA (aglutinina *Pisum sativum*) e JC-1 (J-agregados), MITO (*Mitotracker Green FM*), R-123 (Rodamina 123)..... 81

TABELA 5: Frequências (%) da distribuição por domínios dos compartimentos dos espermatozóides de 26 carneiros da raça Santa Inês após o processo de congelação/descongelação avaliados em microscopia epifluorescente por diferentes combinações de sondas fluorescentes: IP (iodeto de propídeo); FITC-PSA (aglutinina <i>Pisum sativum</i>) e JC-1 (J-agregados), MITO (<i>Mitotracker Green FM</i>), R-123 (Rodamina 123)	89
TABELA 6: Categorização geral do sêmen congelado de 26 carneiros da raça Santa Inês determinada pela associação das sondas fluorescentes iodeto de propídeo, aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada com o isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e <i>Mitotracker Green FM</i> (CELEGHINI, 2005 adaptada).....	91
TABELA 7: Cargas fatoriais e comunalidade, por variável, para fatores não rotacionados e fatores rotacionados pelo método VARIMAX e, variação percentual explicada através de cada fator e total.....	93
TABELA 8: Escore dos coeficientes dos fatores considerando-se os parâmetros de cinética espermática fornecidos pelo sistema CASA para o sêmen congelado de 26 carneiros da raça Santa Inês, tendo como base a variabilidade existente na amostra	95
TABELA 9: Escore dos fatores rotacionados (rot) para 26 amostras de sêmen congelado carneiros da raça Santa Inês com base na variabilidade..	96

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1.	INTRODUÇÃO	25
2.	REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1.	Inseminação Artificial	28
2.2.	Congelação	29
2.2.1.	Efeitos da criopreservação sobre o sêmen	29
2.3.	Análise do sêmen	32
2.3.1.	Análise convencional do sêmen	33
2.3.2.	Análise computadorizada do movimento espermático - CASA	36
2.3.3.	Avaliação das Membranas Espermáticas.....	42
2.3.3.1.	Sondas fluorescentes	43
2.3.3.2.	Membrana plasmática	44
2.3.3.2.1.	Iodeto de propídeo	46
2.3.3.3.	Membrana acrossomal.....	46
2.3.3.3.1.	Aglutininas/lectinas conjugadas a fluoresceínas	47
2.3.3.3.1.1.	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> (PSA).....	48
2.3.3.4.	Membrana mitocondrial	49
2.3.3.4.1.	Rodamina 123	52
2.3.3.4.2.	Sondas <i>Mitotracker</i>	53

2.3.3.4.3.	JC-1	54
3.	OBJETIVOS	57
4.	HIPÓTESE	58
5.	MATERIAL E MÉTODOS	59
5.1.	Local e Período Experimental	59
5.2.	Animais Experimentais	59
5.3.	Procedimentos Experimentais	60
5.3.1.	Colheita e Análise do Sêmen	60
5.3.2.	Procedimento para a congelação do sêmen	61
5.3.3.	Descongelação das amostras	63
5.3.4.	Avaliação das amostras descongeladas	63
5.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
7.	CONCLUSÕES	107
8.	REFERÊNCIAS	109
9.	ANEXO I	119
9.1.	Meio diluente Glicina Gema Leite (GONZALEZ et al., 1996) para congelação do sêmen ovino	119
9.2.	Diluição e preparo das sondas soluções fluorescentes (CELEGHINI, 2005) para avaliação das membranas espermáticas	120
9.2.1.	Iodeto de Propídio - IP	120
9.2.2.	FITC-PSA	121
9.2.3.	Rodamina 123 (R-123, Molecular Probes, R-302 – 25 mg)	121
9.2.4.	<i>Mitotracker Green</i> FM (MITO, Molecular Probes, M-7514, 20 x 50 µg) ..	121

9.2.5.	JC-1.....	122
9.2.6.	Solução de X-Cell®	122
9.3.	CASA - Hamilton IVOS 12.3 - <i>Setup</i> 12.3	123

1. INTRODUÇÃO

Sistemas modernos de produção de ovinos estão associados a vários níveis de intensificação, incluindo do manejo reprodutivo. Um passo crucial para o incremento do desempenho reprodutivo está na redução entre o tempo das parições. Para atingir este objetivo, as biotecnologias de criopreservação do sêmen e inseminação artificial associadas às de sincronização e indução do estro tornaram-se práticas populares (MAXWELL e WATSON, 1996; KARAGIANNIDIS et al., 2001).

A criopreservação do sêmen há muito tem sido vista como uma forma de beneficiar a reprodução dos animais de importância agropecuária, além de ser reconhecida como uma ferramenta para a preservação de espécies em perigo de extinção e de auxiliar em programas de infertilidade humana (WATSON, 2000).

Para a maximização do desempenho dos machos, as biotécnicas envolvendo a criopreservação do sêmen ovino vêm ganhando destaque por propiciarem, além de um banco genético de fácil acesso, a total utilização de machos que apresentem boas características de produção. Entretanto, o processo de criopreservação acarreta uma série de alterações, resultando em uma marcante redução da fertilidade (VALCÁRCEL et al., 1997).

Até recentemente, a análise do sêmen, na maioria dos mamíferos, foi baseada em técnicas clássicas de microscopia, sendo determinados os principais parâmetros da amostra, tais como, concentração, motilidade e morfologia (RIJSSELAERE et al., 2003).

A motilidade espermática tem sido reconhecida por muito tempo como a característica mais importante na avaliação da fertilidade do sêmen, pois ela é responsável pelo transporte do espermatozóide ao longo do genital feminino, possibilitando assim a fertilização (VERSTEGEN et al., 2002).

Nos últimos anos, houve uma evolução nas formas de visualização e avaliação do movimento espermático. Os sistemas computadorizados de análise (CASA), que representam a terceira geração de aparelhos com essa finalidade, propiciaram um salto na maneira de compreender a célula espermática, possibilitando o acompanhamento de uma grande variedade de parâmetros associados a cinética espermática (AMAMM e KATZ, 2004).

Este tipo de análise não determina somente a porcentagem da motilidade, mas também quantifica características específicas do movimento espermático, (GARNER, 1997; MALMGREN, 1997), podendo ainda identificar a presença e a cinética das sub-populações de espermatozóides (MORTIMER, 1997; ABAIGAR, et al., 1999; ABAIGAR, et al., 2001; VERSTEGEN et al., 2002; QUINTERO-MORENO et al., 2003; AMAMM e KATZ, 2004; QUINTERO-MORENO et al., 2004). Contudo ainda há uma subutilização desses sistemas, considerando-se a forma de explorar as informações fornecidas pelo sistema CASA (QUINTERO-MORENO et al., 2003).

A motilidade espermática é uma importante variável função espermática, diretamente dependente da atividade mitocondrial. Alguns laboratórios empregaram uma combinação de sondas fluorescentes específicas para mitocôndrias associadas com a fluorometria fornecendo uma estimativa inicial da qualidade do sêmen. Isto permite uma análise rápida e precisa de milhares de

espermatozóides em cada amostra sendo esta informação correlacionada com a motilidade (MESEGUER et al., 2004b).

Em um empenho de melhorar a precisão e a segurança na análise de sêmen, novas sondas fluorescentes estão continuamente sendo testadas (GARNER et al., 1997).

Frente a isso, teve-se como objetivo otimizar o emprego do sistema de análise computadorizada do movimento espermático através do conhecimento da cinética e identificação das sub-populações de espermatozóides em combinação a sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Inseminação Artificial

Nas ovelhas, os primeiros ensaios sobre a inseminação artificial (IA) foram realizados no início do século XX por Ivanov que analisou meios diluentes e a reprodução assistida visando desenvolver um método prático de inseminação nas fazendas. Depois da Primeira Guerra Mundial, com estudos mais intensivos dirigidos por Milovanov, a IA com sêmen *in natura* e refrigerado passou a ser usada em larga escala nos programas reprodutivos dos ovinos (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Paralelamente à IA com sêmen *in natura*, houve o desenvolvimento de biotécnicas relacionadas à preservação do material seminal por meio da refrigeração ou da congelação (MAXWELL e WATSON, 1996). Para Ollero et al., (1998), Watson (2000) e Naqvi et al., (2001), a preservação do germoplasma pode ser a maior contribuição na manutenção da biodiversidade, permitindo o amplo uso de carneiros superiores para a IA, a conservação *ex situ* de reprodutores elite ou em risco de extinção ou ainda viabilizando questões como a distância entre o local da colheita e o da inseminação, a possibilidade de abranger um grande número de fêmeas em um curto espaço de tempo e um melhor controle da transmissão de doenças.

Maxwell e Watson (1996), Ghalsasi e Nimbkar (1996), Naqvi et al., (1998) e Yoshida (2000) relataram uma limitação na inseminação artificial em ovinos com sêmen congelado devido à baixa fertilidade com o uso da técnica intracervical.

Bunch e Ellsworth (1981) e Naqvi et al., (2001) atribuíram este fato à complexidade da anatomia cervical da ovelha devido às pregas cartilaginosas serem dispostas em diferentes planos e posições, dificultando a inseminação. Mas com o advento da IA com o emprego da laparoscopia, que possibilitou um incremento dos índices de fertilidade, tem se observado um aumento do número de animais inseminados (PERKINS et al., 1996).

Para Watson (2000), a inseminação artificial intra-uterina em ovinos teve sucesso devido a fornecer um número ideal de células viáveis, suficientes para que a fertilização ocorra, pois quando se reduz o número ou a qualidade dos espermatozóides na inseminação, a fertilidade tem uma redução exponencial.

2.2. Congelação

Nos últimos anos várias pesquisas foram desenvolvidas visando a melhoria na congelação do sêmen ovino. Soluções tampão, crioprotetores, açúcares entre outros foram testados. Contudo, apesar do incremento na qualidade do sêmen congelado, ainda não houve progressos significativos na fertilidade do sêmen ovino congelado após a inseminação artificial cervical (MAXWELL e WATSON, 1996).

2.2.1. Efeitos da criopreservação sobre o sêmen

Segundo Watson (2000), aproximadamente 40 a 50% da população total de células espermáticas não sobrevive à criopreservação mesmo em condições ideais de congelação.

O processo de criopreservação pode causar mudanças na morfologia espermática, incluindo danos às mitocôndrias, ao acrossomo e à cauda dos espermatozóides. A proporção de células totalmente funcionais que mantêm intactas suas membranas, cauda e atividade mitocondrial após a congelação é baixa. A motilidade espermática é particularmente afetada nesse processo. Enquanto é globalmente aceito que a motilidade espermática reduz após a criopreservação, o mecanismo que pelo qual isso ocorre ainda é desconhecido (MAXWELL e WATSON, 1996, CONNELL et al., 2002). Maxwell e Watson (1996) têm como hipótese que a criopreservação seleciona apenas algumas células viáveis, restando uma pequena parcela da população total, porém fértil.

Watson (1995) propôs duas hipóteses para explicar a redução da fertilidade do sêmen congelado. A primeira seria que o processo de congelação seleciona os espermatozóides com membranas estáveis e intactas, havendo então uma população uniforme de células móveis, contudo inférteis. A segunda refere-se às modificações que ocorrem nas membranas durante a congelação.

Segundo Celeghini (2005), as lesões ocorridas nas membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozóides, ocasionadas pelo processo de criopreservação, deviam-se às alterações na temperatura e na osmolaridade do meio as quais provocam mudanças morfológicas na organização e composição dos lipídeos das membranas dos espermatozóides. A membrana plasmática exerce um papel fundamental na sobrevivência do espermatozóide no trato reprodutivo feminino e na manutenção de sua capacidade fertilizante, visto que, garante a homeostase celular, sendo essencial para manter a viabilidade. O acrossomo é indispensável para a fertilização. As mitocôndrias, localizadas na

peça intermediária do espermatozóide, são responsáveis pela produção de ATP (adenosina trifosfato), que serve como fonte de energia para o batimento flagelar.

Dessa forma, as modificações ocorridas nas membranas, durante a criopreservação causam, como consequência, prejuízos na motilidade espermática, diminuição da capacidade fertilizante devido a danos ultra-estruturais e bioquímicos, da produção de energia ou até a morte celular (MAXWELL e WATSON, 1996; CELEGHINI, 2005).

Espermatozoides submetidos à congelação também apresentam grandes cristais de gelo nas mitocôndrias e, após a descongelação, há perda de conteúdo estrutural. Portanto, como a fosforilação oxidativa e o transporte de prótons são realizadas na membrana, é provável que a produção de ATP seja prejudicada nesse processo (WATSON, 2000, CELEGHINI, 2005).

A motilidade é uma característica que apresenta uma redução óbvia após a criopreservação, sendo que apenas uma minoria de células apresenta um movimento progressivo vigoroso. Essas características foram avaliadas em programas de fertilização *in vitro* em humanos, verificando-se a grande importância dessas condições (WATSON, 2000).

Considerando-se a avaliação pelo sistema CASA do sêmen congelado humano, Connell et al., (2002) verificaram uma redução significativa nos parâmetros da cinética espermática, com exceção da amplitude lateral de cabeça (ALH).

2.3. Análise do sêmen

Segundo López et al., (1999), a avaliação *in vitro* da qualidade do sêmen pode ser usada para verificação do potencial fertilizante do sêmen ou do reprodutor, servindo não apenas para pesquisa da fisiologia espermática e de sua preservação, mas também para programas de inseminação artificial.

O desenvolvimento de ensaios laboratoriais para predizer com acurácia a capacidade fertilizante do sêmen há muitos anos instiga os pesquisadores (CELEGHINI, 2005).

Estudos têm demonstrado a existência de sub-populações espermáticas funcionalmente diferentes no ejaculado de mamíferos como hamsters, sagüis, garanhões, gazelas, cachacos, humanos, veados ou cães. Essas sub-populações foram definidas por parâmetros isolados tais como características seminais, comportamento frente ao citômetro de fluxo, testes osmóticos, resistência acrossomal, padrão de distribuição específica de glicoconjugados na membrana ou cinética espermática. Esses estudos, principalmente em suínos, levaram pesquisadores a correlacionar as alterações dessas sub-populações com a capacidade fertilizante do ejaculado. Desta forma, houve a abertura para uma nova maneira de analisar a qualidade do sêmen (VERSTEGEN et al., 2002; PÉREZ-LLANO et al., 2003; QUINTERO-MORENO, et al., 2003; BUFFONE et al., 2004; MARTINEZ-PASTOR et al., 2005; NUÑEZ-MARTÍNEZ et al., 2006).

Critérios mais sensíveis de aferição da motilidade e/ou lesão da membrana plasmática têm sido propostos como avaliações finais complementares nas monitorações dos sistemas de conservação espermática. O desenvolvimento de

tecnologias computadorizadas e as variedades de fluorocromos forneceram novas ferramentas de acesso a funcionalidade dos espermatozóides (YOSHIDA, 2000).

Para garantir a fertilidade, o sêmen deve apresentar características mínimas de concentração, motilidade e características morfológicas dos espermatozóides, as quais são parâmetros clássicos na avaliação de amostras de sêmen (WATSON, 2000).

No entanto, nenhum teste laboratorial isoladamente pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen, uma vez que, para ser capaz de fertilizar o oócito e permitir o desenvolvimento embrionário, os espermatozóides precisam apresentar diversos atributos (CELEGHINI, 2005).

2.3.1. Análise convencional do sêmen

Um método clássico de acessar a viabilidade dos espermatozóides é determinando a porcentagem de células com motilidade progressiva usando a microscopia óptica. Este método, que é uma forma indireta de avaliar a atividade metabólica, mostra grande subjetividade e variabilidade nos resultados (TULI et al., 1992; MOSES et al., 1994; GARNER, et al., 1997; MALMGREN, 1997) possibilitando resultados equivocados ou mesmo conclusões conflitantes (RIJSSELAERE et al., 2003).

A grande variabilidade nos resultados da avaliação da motilidade espermática, que podem ser de 30 a 60%, são reflexos das limitações inerentes aos métodos visuais de quantificação da porcentagem de espermatozóides móveis usados rotineiramente pela maioria dos laboratórios que processam

sêmen (TULI et al., 1992; MOSES et al., 1994; GARNER et al., 1997; MALMGREN, 1997; VERSTEGEN et al., 2002).

No acesso visual há uma tendência em se subestimar a porcentagem de espermatozóides móveis, especialmente em amostras com alta concentração espermática. Trata-se mais de uma estimativa comparativa do que uma mensuração absoluta (MIES FILHO, 1987; GARNER, 1997).

A motilidade espermática é uma avaliação importante da função espermática, diretamente dependente da atividade mitocondrial e o método clássico de avaliá-la no espermatozóide é pela determinação da porcentagem de células com motilidade progressiva no microscópio óptico (MESEGUER et al., 2004b).

Para Maxwell e Watson (1996) e Oehninger et al., (2000), a viabilidade dos espermatozóides analisada através da motilidade foi maior do que sua real capacidade de fertilização, em decorrência das alterações nas membranas celulares durante a criopreservação.

Conforme citado por Papaioannou et al., (1997), a avaliação da motilidade isoladamente é inadequada para predizer a capacidade fertilizante do sêmen.

As análises padrão do sêmen humano e de outros mamíferos também incluem a concentração espermática e a morfologia como indicadores fundamentais da fertilidade do macho (VERSTEGEN et al., 2002, RIJSSELAERE et al., 2003; MARCHETTI et al., 2004).

A motilidade e o vigor são aspectos importantes a serem considerados na análise da qualidade do sêmen (FONSECA, et al., 1992), e, segundo Varner et al., (1991) e Malmgren (1997), a motilidade é um dos melhores critérios para predizer

a fertilidade do macho. Para Holt (2000), a avaliação da motilidade espermática após a descongelação é amplamente utilizada, apesar de ser uma maneira simplista de análise da sobrevivência espermática.

Segundo Quintero-Moreno et al., (2003), esta análise clássica tende a negligenciar a existência de sub-populações espermáticas, podendo assim interferir severamente na avaliação correta da qualidade do sêmen. Para Abaigar et al., (1999), diferentes sub-populações de espermatozóides coexistem no ejaculado dos mamíferos e, segundo Buffone et al., (2004), estas sub-populações heterogêneas possuem diferentes níveis de maturidade, variando em funcionalidade e qualidade, assim como, na habilidade em realizar a fertilização.

De forma geral, o padrão atualmente empregado na avaliação do sêmen congelado de ovinos tem sua origem portaria SDR-26; 05/09/96 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento em parceria com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal na qual o será considerado fora do padrão as amostras que apresentarem após a descongelação a 35-37° C, por um tempo mínimo de 30 segundos ou conforme recomendações do estabelecimento produtor, os seguintes parâmetros (HENRY e NEVES, 1996):

- volume da dose inferior a 0,15 mL;
- motilidade progressiva convencional inferior a 30% (0-100%);
- vigor inferior a 3 (0-5);
- anormalidades espermáticas totais superior a 20% (0-100%) e defeitos maiores superiores a 10% e;

- número de espermatozóides com motilidade progressiva inferior a 40×10^6 por dose.

2.3.2. Análise computadorizada do movimento espermático - CASA¹

Nas últimas décadas, diversos sistemas de análise computadorizada do movimento espermático (CASA) têm sido propostos e aplicados na tentativa de minimizar os efeitos da avaliação convencional do sêmen, além de incrementar o estudo da andrologia humana e das espécies animais (MALMGREN, 1997; TARDIF et al., 1997; VERSTEGEN et al., 2002; AMANN e KATZ, 2004).

Segundo Amann e Katz (2004), CASA refere-se a um sistema automatizado (*hardware e software*) para visualizar e digitalizar imagens sucessivas dos espermatozóides, processando, analisando e fornecendo informações acuradas, precisas e significativas da cinética individual das células, e também valores estatísticos médios sumarizados da população global.

Resumidamente, os espermatozóides móveis observados são posteriormente identificados em imagens sucessivas, que permitem estabelecer suas trajetórias. Finalmente as trajetórias obtidas são matematicamente processadas permitindo a definição dessas trajetórias de forma numérica. Os resultados desses processamentos são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozóide (QUINTERO-MORENO et al., 2003).

¹ CASA – Computer Assisted Semen Analyses

Os equipamentos utilizados no sistema CASA variam largamente entre as máquinas, nas ópticas e *software* usados na identificação espermática e reconstrução de sua trajetória (VERSTEGEN et al., 2002).

Os sistemas CASA da empresa *Hamilton Thorne Bioscience* utilizam-se de uma iluminação estroboscópica de 662 nm para obter imagens precisas dos espermatozóides móveis. Essa iluminação atinge a amostra a ser avaliada com uma série de *flashes* de 1 a 3 milissegundos em uma frequência de 60 Hz. Efetivamente congelando a imagem do espermatozóide durante a captura da imagem, a iluminação estroboscópica assegura imagens exatas das células em movimento, removendo erros devido a imagens desfocadas².

Apesar do seu alto custo, o sistema CASA oferece automatismo, rapidez, objetividade e repetibilidade nas avaliações, possibilitando detalhar melhor a qualidade do sêmen analisado e assim fornecendo informações adicionais sobre as características de movimentação dos espermatozóides, as quais apresentam limitação a observação convencional (MATHUR et al., 1986; JASKO et al., 1988; AMANN, 1989; VANTMAN et al., 1989; ANZAR et al., 1991; MOSES et al., 1994; MALMGREN, 1997; FERREIRA, 2000; YOSHIDA, 2000; QUINTERO-MORENO et al., 2003; AMANN e KATZ, 2004).

Este tipo de análise não determina somente a porcentagem da motilidade, mas também quantifica características específicas do movimento espermático, (GARNER, 1997; MALMGREN, 1997), podendo ainda determinar a presença e a cinética das sub-populações de espermatozóides, como a avaliação da

² Technical Guide, Hamilton Thorne Biosciences, chapter 3: Theory of Operation, 2005.

integridade das células por meio de sondas fluorescentes (MORTIMER, 1997; ABAIGAR, et al., 1999; VERSTEGEN et al., 2002; QUINTERO-MORENO et al., 2003). Segundo relatado por Silva e Gadella (2006), a análise computadorizada do movimento espermático ainda pode ser uma alternativa para detecção da produção de ATP pelos espermatozóides.

Desta forma, Moses et al., (1994) relataram que o conjunto destes parâmetros fornece detalhes que possibilitariam melhor avaliação da qualidade do sêmen, ou ainda, conforme AMANN e KATZ (2004), predizer o potencial de fertilidade do macho ou selecionar o melhor procedimento na manipulação do sêmen.

Outra possibilidade relatada por Farrell et al., (1995), foi que a repetibilidade existente entre as análises e equipamentos permitia a comparação dos resultados apresentados por diferentes laboratórios.

Segundo Sánchez-Partida et al., (1999), os parâmetros analisados pelo sistema CASA têm sido correlacionados com taxas de fertilidade *in vitro* dos espermatozóides humanos e com as taxas de não retorno ao estro em vacas inseminadas com sêmen bovino criopreservado, ou com os índices de fertilidade *in vivo* com sêmen refrigerado de suínos.

A validação destas informações dependerá de uma preparação cuidadosa da amostra e um ajuste adequado do equipamento (*Setup*) visando identificar corretamente as células móveis, imóveis e outras partículas, geralmente estáticas, que não os espermatozóides, obtendo-se resultados seguros e comparáveis na análise (MOSES et al., 1994, HOLT e PALOMO, 1996; TARDIF et al., 1997;

VERSTEGEN et al., 2002). Para Rijsselaere et al., (2003), este poderia ser um dos maiores problemas do sistema CASA.

Esta padronização do *setup* também é um requisito para que possam existir comparações de dados entre os centros de pesquisa e laboratórios, servindo de base para o intercâmbio tecnológico (RIJSSELAERE et al., 2003).

De modo geral, os parâmetros³ “clássicos” da cinética espermática avaliados pelo sistema CASA são (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002; MORTIMER e MAXWELL, 2004):

- ❖ Motilidade total – MT - %. É a razão das células móveis na concentração espermática total.
- ❖ Motilidade progressiva – MP - %. É a razão das células móveis com movimento progressivo na concentração espermática total.
- ❖ Velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme desprezando-se o deslocamento lateral da célula espermática ou velocidade de trajeto – VAP - $\mu\text{m/s}$. É a indicação do comprimento da trajetória geral do espermatozóide e é calculado encontrando-se o comprimento do caminho médio corrigido pelo tempo. Esse algoritmo é usado para reduzir os efeitos da amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH), obtendo-se uma trajetória mais representativa da posição espermática ao longo do movimento.
- ❖ Velocidade retilínea considerando-se a trajetória espermática como uma reta ou velocidade progressiva – VSL - $\mu\text{m/s}$. É a distância

3 Technical Guide, Hamilton Thorne Biosciences, chapter 1: Output Data Definitions, 2005.

considerando-se uma linha reta entre o ponto inicial e o final da trajetória dividida pelo tempo decorrido.

- ❖ Velocidade de deslocamento real dos espermatozóides ou velocidade curvilinear – VCL - $\mu\text{m/s}$. É a distância total entre cada posição do centro da célula durante a captura da imagem, dividida pelo tempo decorrido ou a distância percorrida pelo espermatozóide ao longo de seu caminho curvilinear, sendo calculada através da somatória das distâncias ao longo da trajetória e então corrigida pelo tempo.
- ❖ Amplitude do deslocamento lateral da cabeça – ALH - μm . Corresponde à largura média da oscilação da cabeça do espermatozóide durante seu deslocamento. É utilizada como uma aproximação do batimento flagelar, não sendo uma amplitude verdadeira por não medir a distância perpendicular entre o pico de uma onda e o ponto de inflexão da curva, mas informando a distância entre o “pico” e “depressão” da trajetória.
- ❖ Frequência de batimento – BCF – Hz. Determinada pela medida da frequência com que a linha da cabeça espermática atravessa a trajetória celular em qualquer direção. Ela foi desenvolvida visando fornecer indicações da frequência do batimento flagelar baseada nos fatos de que cada ponto é resultado da mudança no batimento, e que em cada momento que o caminho curvilíneo cruza o caminho

médio é o resultado de um novo batimento flagelar, assumindo que o espermatozóide gira a cada início de batimento.

- ❖ Retilinearidade – STR %. É a medida do afastamento da trajetória da célula espermática considerando-se uma linha reta. É a indicação da relação entre o espaço ganho e a trajetória geral do espermatozóide, calculado pela relação entre **(VSL/VAP) x 100** (uma comparação da linha reta com a média dos caminhos). Uma trajetória com pontos espaçados de forma uniforme e com baixa amplitude teria um alto valor de STR, uma vez que o caminho médio seria próximo do caminho em linha reta. Uma trilha circular teria um baixo STR, pois o caminho médio é a média do caminho curvilíneo, desta forma o STR seria maior do que o LIN, mas ainda permaneceria baixo.
- ❖ Linearidade – LIN - %. É a medida do afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta. É a expressão da relação entre a projeção bi-dimensional do caminho tri-dimensional adotado pelo espermatozóide (exemplo: caminho curvilíneo) e seu ganho de espaço. É a razão entre **(VSL/VCL) x 100**. (comparação da linha reta e os caminhos curvilíneos). Uma trajetória circular teria uma baixa linearidade, pois o caminho curvilíneo (exemplo: circunferência do círculo) seria muito maior do que o espaço ganho (exemplo: a distância entre os primeiros e últimos pontos da trajetória). Uma alta linearidade na trajetória é aquela que ocorre quando um caminho curvilíneo tem uma amplitude

relativamente baixa do deslocamento lateral da cabeça (ALH) e a direção geral do movimento é a mesma do caminho em linha reta.

- ❖ Wobble – WOB - %. É a expressão utilizada para a relação entre os caminhos médios e curvilinear, calculada por $(VAP/VCL) \times 100$. O WOB seria baixo para um deslocamento com uma trajetória ampla (alto ALH), mas alto para um trajeto circular, visto que os caminhos médios e curvilinear seriam similares.

Dois valores derivados da cinética estão sendo utilizados na determinação da hiper-ativação. São eles descritos como: *Dance* ($= VCL \times ALH_{mean}$) e *Dancemean* ($DNC_{mean} = VCL/VSL \times ALH_{mean}$), sendo ALH_{mean} a média de todos ou de alguns valores de ALH ao longo da trajetória (MORTIMER, 1997).

A terminologia empregada nos parâmetros fornecidos pelo sistema CASA foi padronizada em 1988 após dois encontros de consenso realizados pela Sociedade Americana de Andrologia em Houston, Texas, e a Federação CECOS, em Montpellier, na França (MORTIMER, 1997).

De acordo com os valores de corte (*cut-off*) de VAP baixo (LVV) e médio (MVV), a população espermática ainda pode ser subdividida em quatro categorias, sendo células com movimento rápido ($VAP > MVV$), médio ($LVV < VAP < MVV$), lento ($VAP < LVV$) e paradas (VERSTEGEN et al., 2002).

2.3.3. Avaliação das Membranas Espermáticas

Segundo Silva e Gadella (2006), para que ocorra a concepção, o espermatozóide deve possuir, de forma geral, seus componentes de membrana, organelas e genoma haplóide intactos.

Muitos testes para avaliar a função espermática foram desenvolvidos nos últimos anos, o que permite analisar simultaneamente diferentes aspectos da função espermática. A maioria deles inclui aspectos funcionais como a integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, e a reação acrossomal frente a determinado estímulo externo e motilidade (HOLT, 2000).

Os espermatozóides são constituídos por vários compartimentos inclusos dentro das membranas plasmáticas e mitocondrial. Essas membranas devem permanecer intactas e funcionais para permitir a competência celular, sendo essenciais à proteção, funcionamento celular e fundamentais ao processo de fertilização sendo um importante parâmetro de avaliação (MALMGREN, 1997; NEILD et al., 1999; PAGANINI FILHO, 1999; CONNELL et al., 2002).

A susceptibilidade das membranas plasmática e mitocondrial aos danos decorrentes da criopreservação pode ser diferente em função da acessibilidade do crioprotetor. A extensão da lesão causada à membrana plasmática foi próxima das células que tiveram redução da função mitocondrial. Isto sugere que a redução da motilidade pode ser explicada por uma deterioração da atividade mitocondrial (CONNELL et al., 2002).

2.3.3.1. Sondas fluorescentes

O emprego de sondas fluorescentes foi estudado para a avaliação da integridade do espermatozóide. Apesar do alto custo, elas podem fornecer informações do estado funcional dos espermatozóides. Uma variedade de sondas tem sido utilizada na avaliação dos diferentes componentes celulares (MALMGREN, 1997; NEILD et al., 1999; HOLT, 2000).

A fluorescência é um indicador sensível e específico do estado de certas moléculas tais como oxidadas, reduzidas; ionizadas, não ionizadas; livres ou ligadas, podendo ser aplicada como um meio de medir mudanças metabólicas dentro de células vivas (CELEGHINI, 2005).

Segundo Holt (2000) alguns mecanismos que envolvem as técnicas fluorescentes e, conseqüentemente sua validade, algumas vezes são questionados. Em um empenho de melhorar a precisão e a segurança na análise de sêmen, novas sondas fluorescentes estão continuamente sendo testadas (GARNER et al., 1997).

2.3.3.2. Membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática é essencial para a manutenção da viabilidade espermática (PAPAIOANNOU et al., 1997), pois a membrana plasmática é responsável pelo mecanismo de manutenção de gradiente de equilíbrio osmótico, atuando como uma barreira seletiva entre os meios intra e extracelular. Proteínas específicas da membrana plasmática facilitam o transporte de glicose e frutose do meio extracelular para dentro do espermatozóide, sendo este uma indispensável fonte de substrato energético, pois no espermatozóide maduro, 90% do ATP é produzido por glicolise (SILVA e GADELLA, 2006).

Danos nesta estrutura podem levar a perda da homeostase com posterior morte celular. Assim, a integridade da membrana plasmática exerce papel fundamental para a sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e para a manutenção de sua capacidade fertilizante (CELEGHINI, 2005). Para Magistrini et al., (1997), a integridade da membrana plasmática pode ser

considerada como um indicador indireto da viabilidade espermática e, segundo Silva e Gadella (2006), *in vivo*, um espermatozóide com a membrana plasmática afuncional torna-se incapaz de realizar a fertilização.

A integridade da membrana plasmática é usualmente verificada após a coloração com sondas impermeáveis à membrana. As células que são capazes de excluir essas sondas podem ser consideradas vivas. Uma combinação de sondas fluorescentes impermeáveis com afinidade pelo DNA é atualmente usada com essa finalidade (SILVA e GADELLA, 2006).

Várias sondas com esse princípio têm sido testadas nos espermatozóides, diferindo quanto às propriedades de excitação e emissão: Hoechst 33258; YoPro-1; iodeto de propídeo ou etídio homodímero-1; ToPro-3 e TOTO (MAGISTRINI et al., 1997; SILVA e GADELLA, 2006).

Uma forma alternativa ou simultânea de estudar a integridade da membrana é o uso de sondas de membrana acetiladas. Devido à sua porção acetilada, essas sondas de membrana são anfipáticas e podem passar pela membrana íntegra e entrarem nos espermatozóides vivos. A sonda quando entra é rapidamente deacetilada por esterases intracelulares, deixando a sonda impermeável. Derivados do diacetato e carboximetil fluoresceína têm sido usados para corar espermatozóides viáveis. Recentemente, uma nova sonda acetilada, o SYBR-14, foi introduzida na espermatologia. Uma vez que o SYBR-14 entra na célula viável, a sua deacetilação resulta na ligação da sonda com o DNA, revelando propriedades fluorescentes (SILVA e GADELLA, 2006).

2.3.3.2.1. Iodeto de propídeo

A sonda iodeto de propídeo (IP) é um corante fluorescente que possui afinidade pelo DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (PAPAIOANNOU et al., 1997, CELEGHINI, 2005).

Foi demonstrado por microscopia eletrônica que o IP é altamente seletivo por corar somente as estruturas que contenham ácidos nucleicos de dupla hélice. A membrana plasmática dos espermatozóides viáveis é impermeável ao IP, sendo por isso não corados os seus núcleos (PAPAIOANNOU et al., 1997).

Por ser um corante fluorescente muito estável, o IP vem sendo utilizado em uma grande quantidade de trabalhos para avaliação dos espermatozóides, apresentando êxito nos resultados tanto com o sistema de citometria de fluxo quanto em microscopia de epifluorescência (CELEGHINI, 2005).

2.3.3.3. Membrana acrossomal

O acrossomo é uma grande organela secretória ácida, derivada do retículo endoplasmático/complexo de Golgi. Ele é preenchido com enzimas hidrolíticas, organizadas em uma matriz enzimática, e a maioria das enzimas são glicosiladas. A ligação inicial do espermatozóide com a zona pelúcida tem como objetivo a reação acrossomal, resultando na liberação e ativação das enzimas acrossomais (SILVA e GADELLA, 2006).

A reação acrossomal associada com a hiper-ativação ajudará na penetração do espermatozóide na zona pelúcida e sua fusão com a membrana plasmática do oócito. Portanto, a integridade do acrossomo, bem como a

manutenção de suas enzimas, são cruciais para que ocorra a fertilização (CELEGHINI, 2005, SILVA e GADELLA, 2006).

Reações acrossomais prematuras levam a espermatozóides inférteis e, por isso, a avaliação da integridade acrossomal antes dos processos de reprodução assistida vem sendo cada vez mais empregada (SILVA e GADELLA, 2006).

2.3.3.3.1. Aglutininas/lectinas conjugadas a fluoresceínas

A condição acrossomal (*status* acrossomal) pode ser verificada por diferentes técnicas, entre elas as lectinas conjugadas a fluoresceína. As lectinas conjugadas ligam-se a porções específicas de carboidratos das glicoproteínas que estão exclusivamente localizadas no acrossomo (VALCÁRCEL et al., 1997, SILVA e GADELLA, 2006).

A natureza ácida do acrossomo intacto sugere o uso de sondas acidofílicas como marcador da integridade acrossomal. Ainda, o caráter glicoprotéico dos componentes acrossomais fornece um outro meio de mensurar a integridade acrossomal, por preenchimento fluorescente da matriz acrossomal de espermatozóides com o acrossomo lesado com lectinas marcadas (CELEGHINI, 2005).

Dependendo da espécie de mamífero, as lectinas conjugadas mais usadas são a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), aglutinina de *Ricinus communis* (RCA), aglutinina de *Arachis hypogea* (PNA), *Triticum vulgaris* (WGA), sendo a *Concanavalia ensiformis* (ConA) a mais usada em espermatozóides humanos (VALCÁRCEL et al., 1997, SILVA e GADELLA, 2006).

Por estudos ultra-estruturais pode-se avaliar a localização nos espermatozóides das lectinas conjugadas. Nos espermatozóides de suínos, eqüinos e caninos, o PNA teve ligação específica pela membrana acrossomal externa, enquanto que o PSA, pelas glicoproteínas da matriz acrossomal. Tanto a conA como o PSA podem também se ligar a porções da membrana plasmática do espermatozóide (CELEGHINI, 2005, SILVA e GADELLA, 2006).

Para a visualização do acrossomo espermático em microscopia de epifluorescência, estas aglutininas devem ser conjugadas a fluoresceínas, tais como o isotiocionato de fluoresceína (FITC) (CELEGHINI, 2005).

Segundo Silva e Gadella, (2006), a característica ácida do acrossomo, similar a do lisossomo, permite que sondas inicialmente como o *LysoTracker Green* TM, usada para avaliar o lisossomo, possam ser utilizadas para sua avaliação. Uma variedade de outros *LysoTrackers* está atualmente disponível para essa avaliação. Outra possibilidade de avaliação da integridade do acrossomo inclui o uso de anticorpos contra proteínas específicas intra-acrossomais, entre elas a proteína da membrana acrossomal interna CD 46.

2.3.3.3.1.1. Aglutinina de *Pisum sativum* (PSA)

Segundo Magistrini et al., (1997), uma das aglutininas conjugadas a fluoresceínas mais empregada é a *Pisum sativum* (PSA).

A aglutinina de PSA, oriunda de ervilha, liga-se os glicoconjugados da matriz acrossomal, tendo afinidade para as terminações α -D-glicosil e resíduos α -D-manosil de glicoproteínas, ligando-se especificamente ao açúcar α -manosidase

encontrado no conteúdo acrossomal. Esta aglutinina, quando conjugada à FITC, marca com sucesso o acrossomo espermático em verde amarelado, facilitando a visualização e identificação dos acrossomos lesados, podendo ser aplicado aos espermatozóides de várias espécies (CELEGHINI, 2005).

Segundo Silva e Gadella (2006), a ausência da fluorescência é indicativo de células com o acrossomo intacto, e a fluorescência evidencia lesões ou reação acrossomal.

2.3.3.4. Membrana mitocondrial

Durante a espermatogênese, importantes mudanças estruturais e funcionais ocorrem na mitocôndria. Devido a elas, as organelas são então preparadas para fornecer a energia requerida pelo espermatozóide para a realização da fecundação (RUIZ-PESINI et al., 2000).

As mitocôndrias espermáticas estão localizadas na peça intermediária enroladas sobre a parte principal do flagelo (SILVA e GADELLA, 2006).

A principal função das mitocôndrias nas células vivas é realizar a fosforilação oxidativa e produzir ATP como origem de energia metabólica. A membrana mitocondrial interna é o local de produção de energia, sendo essencial para a suplementação de ATP para o batimento flagelar, possibilitando a propulsão dos espermatozóides (AUGER et al., 1989; CELEGHINI, 2005, SILVA e GADELLA, 2006).

A síntese de ATP mitocondrial é dirigida pelo potencial de membrana mitocondrial interno que é gerado pela cadeia respiratória. A capacidade para monitorar mudanças no potencial de membrana em mitocôndrias dentro das

células pode ser crucial para a interpretação de mudanças na fisiologia celular em várias situações experimentais (CELEGHINI, 2005).

Nas células espermáticas, as mitocôndrias estão dispostas de forma helicoidal na peça intermediária e o ATP produzido serve como suplemento energético para os batimentos flagelares, a hiper-ativação e a penetração do espermatozóide no oócito. Portanto, é indispensável que haja produção de ATP pelas mitocôndrias para haver motilidade espermática (PAPAIOANNOU et al., 1997, CONNELL et al., 2002).

As mitocôndrias são as principais células produtoras de energia oxidativa através da produção de ATP via cadeia de transporte de elétrons (CONNELL et al., 2002) ou via glicólise (SILVA e GADELLA, 2006).

A análise da função mitocondrial pode oferecer uma maneira de acessar a motilidade espermática (RUIZ-PESINI et al., 2000; MARCHETTI et al., 2004). Isto pode ser obtido pela determinação do potencial mitocondrial da membrana interna ($\Delta\psi_m$) das células espermáticas. O $\Delta\psi_m$ é um sensível indicador da condição energética da mitocôndria e da célula e pode ser usado para acessar a atividade da cadeia respiratória, sistema de transporte de elétrons e a ativação da transição da permeabilidade mitocondrial. Em humanos, foi verificada uma correlação entre a função mitocondrial pobre detectada pela redução do $\Delta\psi_m$ e a diminuição da motilidade, com conseqüente redução da fertilidade (MARCHETTI et al., 2004).

Para Meseguer et al., (2004a), a atividade mitocondrial não é um bom indicador para prever a sobrevivência espermática após a criopreservação. É bem aceito que a atividade mitocondrial é diretamente relacionada com a

motilidade espermática, mas nenhuma correlação foi encontrada entre elas após o ciclo congelamento/ descongelamento. Silva e Gadella (2006), relataram que a importância da mitocôndria para a motilidade espermática deve ser reconsiderada.

Muitos indicadores para o monitoramento do potencial de membrana de mitocôndrias têm sido discutidos havendo grande ênfase em favor das sondas fluorescentes associadas com a fluorometria, o que fornece uma estimativa inicial da qualidade do sêmen. Das sondas com sensibilidade ao potencial de membrana mitocondrial as mais comuns são as rodaminas e as carbocianinas. O sucesso para o uso dessas sondas em células vivas é baseado no fato de não serem destrutivas nem causarem toxicidade. Também permitem uma análise rápida e precisa de milhares de espermatozóides em cada amostra, sendo altamente correlacionadas com a motilidade. Adicionalmente, esta avaliação da motilidade pode servir como estimativa da proporção de células viáveis (CONNELL et al., 2002, MESEGUER et al., 2004b, CELEGHINI, 2005).

Usando essas sondas, a função mitocondrial pode ser avaliada de duas formas. A porcentagem de espermatozóides que exibem a captação da sonda indica aqueles espermatozóides dentro da população com mitocôndria funcional. Na outra forma, pode-se refinar a mensuração da atividade dentro da mitocôndria, quantificando a intensidade da fluorescência individualmente nesses espermatozóides. A sensibilidade de cada sonda tem sido avaliada e os resultados se correlacionaram (CONNELL et al., 2002).

2.3.3.4.1. Rodamina 123

A sonda mitocondrial específica mais amplamente utilizada foi a rodamina 123 (R-123). Trata-se de um componente catiônico que se excita a 488 nm e emite uma fluorescência verde a 515-575 nm (GARNER et al., 1997). A R-123 é um fluorocromo capaz de corar mitocôndrias e promover imagens de alta fluorescência de mitocôndrias em células vivas (MAGISTRINI et al., 1997; CELEGHINI, 2005).

A R-123 se acumula na mitocôndria e fluoresce em verde, identificando os espermatozóides que exibem um potencial de membrana mitocondrial (GARNER et al., 1997). Deste modo, a sonda R-123 pode ser utilizada para detectar mitocôndrias funcionais nas células espermáticas (CELEGHINI, 2005).

Segundo Papaioannou et al., (1997), a sonda R-123 foi validada no citômetro de fluxo para determinar a atividade mitocondrial em espermatozóides humanos e bovinos. CONNELL et al., (2002) utilizaram um microscópio epifluorescente com filtro de excitação de 515-560 nm em lâmpada de mercúrio de 100 W e um filtro barreira de 590 nm.

Mudanças na atividade mitocondrial são concomitantes com alterações na intensidade de fluorescência da R-123. O acúmulo de R-123 é um processo de ligação energética, realizado apenas pela mitocôndria que retém a sonda R-123 em sua membrana mitocondrial quando intacta e funcional, sendo essa energia derivada do transporte de elétrons durante a fosforilação oxidativa (PAPAIIOANNOU et al., 1997, SILVA e GADELLA, 2006).

Segundo citado por Papaioannou et al., (1997), a R-123 é acumulada, primariamente, pela mitocôndria do flagelo dos espermatozóides e a intensidade da fluorescência da R-123 depende da quantidade total de mitocôndrias funcionais no flagelo. Há uma aparente relação entre a atividade mitocondrial e a motilidade espermática. A função mitocondrial no espermatozóide humano acessado pela R-123 foi correlacionada com parâmetros de motilidade baseados na citometria de fluxo e na análise computadorizada do movimento espermático. O processo de coloração da R-123 não alterou o metabolismo celular, não sendo tóxica os espermatozóides bovinos congelados devido a não reduzir a taxa de consumo de oxigênio das células coradas quando comparadas com as não tratadas.

2.3.3.4.2. Sondas *Mitotracker*

Recentemente houve o desenvolvimento de novas sondas como o *Mitotracker Deep Red* TM, *Mitotracker Red* TM, *Mitotracker Orange* TM e o *Mitotracker Green* TM, os quais têm seletividade pela respiração mitocondrial, podendo ser utilizados para avaliação de diversos parâmetros espermáticos (SILVA e GADELLA, 2006).

A sonda mitocondrial *Mitotracker Green* FM (MITO) não é fluorescente em solução aquosa e fluoresce em verde quando acumulada em mitocôndrias, independentemente do potencial de membrana. A excitação e a emissão máxima são 490 e 516 nm, respectivamente (GARNER et al., 1997; CELELGHINI, 2005).

A sonda MITO é um corante mitocondrial seletivo que é concentrado pelas mitocôndrias ativas e que pode ser retido durante a fixação (MESEGUER et al., 2004a).

Segundo Celeghini (2005), em células espermáticas criopreservadas de bovinos, observou-se que a porcentagem de espermatozóides com mitocôndrias coradas pelo MITO foi altamente correlacionada com a porcentagem de motilidade espermática ($r=0,96$).

2.3.3.4.3. JC-1

Outra sonda do grupo *Mitotracker* é a JC-1 (SILVA e GADELLA, 2006). Trata-se de um tipo especial de multímeros de carbocianinas, o qual foi identificado primeiramente por Jelly em 1937 e, por isso, chamado de J-agregados (3,3'-dipentiltiodicarbocianina). Essa sonda tem sido explorada para visualizar mitocôndrias em uma variedade de células, sendo o mais utilizado o corante identificado como iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianina (JC-1; COSSARIZZA et al., 1993; CELEGHINI, 2005).

A sonda mitocondrial JC-1 existe como um monômero que tem pico de excitação e emissão em comprimento de onda verde (510-520 nm). Entretanto, também exibe um segundo pico em uma variação vermelho-alaranjada (590nm). Este fenômeno de polarização produz uma fluorescência vermelho-alaranjada referida como a formação de J-agregados (COSSARIZZA et al., 1993). A proporção da fluorescência vermelho alaranjada:verde (agregados:monômeros) depende do potencial de membrana mitocondrial. Mitocôndrias com alto potencial

de atividade de membrana fluorescem em vermelho alaranjada, enquanto aquelas com baixo a médio potencial, em verde (GARNER et al., 1997). Desta forma, o JC-1 identifica populações de mitocôndrias com diferentes potências de membrana por meio de códigos de cor (CELEGHINI, 2005).

O JC-1 difere das rodaminas e de outras carbocianinas por produzir dois picos de emissão de fluorescência que refletem a existência de duas formas da sonda. O monômero JC-1 que emite uma fluorescência verde é predominante em baixo $\Delta\psi_m$ enquanto o agregado JC-1 (fluorescência vermelho alaranjado) predomina em alto $\Delta\psi_m$. Tipicamente é descrito que, abaixando o $\Delta\psi_m$, os agregados JC-1 dissipam-se em monômeros e levam a uma mudança da fluorescência vermelha para a verde. De fato, a intensidade da fluorescência verde do monômero JC-1 parece ser insensível às mudanças de $\Delta\psi_m$ e foi usada para monitorar a massa mitocondrial (MARCHETTI et al., 2004).

Devido à sensibilidade do JC-1 à transição do potencial de membrana, uma redução no potencial de membrana tem sido associada com uma redução dos agregados e um aumento dos monômeros (GARNER et al., 1997).

A sonda fluorescente JC-1 vem sendo utilizada como um suporte no diagnóstico de infertilidade humana, identificando espermatozóides com baixo potencial de membrana mitocondrial. Podem detectar acuradamente mudanças no potencial de membrana de várias espécies. Ainda vem sendo utilizada para avaliar os efeitos da criopreservação sobre o potencial de membrana de mitocôndrias de espermatozóides bovinos (CELEGHINI, 2005).

Marchetti et al., (2004) relataram que a sonda JC-1 teria distribuição exclusiva na mitocôndria, além de possuir característica de emissão dupla. Devido a isso, ela foi escolhida para monitorar o $\Delta\psi_m$, pois permite uma mensuração com grande acurácia do $\Delta\psi_m$ nas células intactas, incluindo os espermatozóides.

3. OBJETIVOS

1. Otimizar o emprego do sistema de análise computadorizada do movimento espermático associado à presença de sub-populações de espermatozóides no sêmen congelado de carneiros.
2. Determinar, no sistema computadorizado de análise do sêmen, qual(is) parâmetro(s) da cinética espermática pode(m) expressar analogia com as características obtidas na avaliação em microscopia epifluorescente com a combinação das sondas determinantes da condição das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial.
3. Utilizar conjuntamente os parâmetros fornecidos pelo sistema de análise computadorizada do movimento espermático (CASA) e a combinação de sondas fluorescentes para agrupar, de maneira qualitativa, amostras de sêmen congelado de ovinos.

4. HIPÓTESE

1. O sistema de análise computadorizada do movimento espermático (CASA) fornece dados sobre a presença de sub-populações de espermatozóides no sêmen congelado de ovinos, o que permite uma avaliação detalhada da amostra.
2. A avaliação das sub-populações através da análise individual dos espermatozóides permite um melhor entendimento dos efeitos da criopreservação no sêmen ovino.
3. Os parâmetros da cinética das sub-populações espermáticas apresentam analogia com os dados de potencial de membrana mitocondrial avaliados por meio da combinação de sondas fluorescentes em microscopia epifluorescente.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local e Período Experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Estudos em Biotecnologia da Reprodução de Ovinos e Caprinos e no Laboratório de Fluorescência do Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP Botucatu – SP (latitude 22° 53' S, longitude 48° 29' W), durante os meses de novembro de 2005 a maio de 2006.

5.2. Animais Experimentais

Dentro de um conjunto de 30 carneiros da raça Santa Inês, foram selecionados, por meio de exame andrológico (MORAES et al, 1981, EVANS e MAXWELL, 1987, GUERIN, 1990, FONSECA et al. 1992), vinte e seis (26) animais com idade entre um e três anos, peso médio de 103 Kg (88 Kg a 118 Kg) e mantidos durante o período das avaliações e congelações sob as mesmas condições de instalações e manejo no Laboratório de Estudos em Biotecnologia da Reprodução de Ovinos e Caprinos do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP Botucatu – SP.

5.3. Procedimentos Experimentais

5.3.1. Colheita e Análise do Sêmen

Previamente ao início das colheitas de sêmen destinadas à congelação foi realizado um nivelamento biológico dos reprodutores no qual, após um período de adaptação de aproximadamente uma semana, os animais foram submetidos a um regime de colheitas de sêmen e exames clínico-andrológicos conforme citado anteriormente.

Realizou-se uma colheita de sêmen de cada reprodutor por meio de vagina artificial, utilizando-se ovelha estrogenizada (MIES FILHO, 1987), totalizando 26 amostras.

Após as colheitas, foram avaliados os parâmetros espermáticos:

- Volume do ejaculado (mL) e aspecto no próprio frasco coletor
- Motilidade convencional (0-100%) e vigor (0-5). Para a realização dessas avaliações, uma alíquota de sêmen *in natura* foi previamente diluída em meio X-Cell^{®4} (HANSEN, 2005⁵), sendo posteriormente analisada em microscopia óptica de contraste de fase em aumento 200X após a confecção em lâmina pré-aquecida a 37° C.

4 IVP do Brasil

5 Hansen, G. D. Diretor IMV – França. Informação obtida durante Curso Prático de Biotecnologia e Reprodução da Ovinocaprinocultura. IVP do Brasil / Depto Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - FMVZ Unesp Botucatu, 2005

Os ejaculados que apresentaram motilidade convencional igual ou superior a 80% após a análise convencional (VULCANO et al., 1998) foram selecionados para a congelação, determinando-se a concentração espermática.

- Concentração espermática ($\times 10^6$), foi determinada com o emprego da câmara de Neubauer após diluição de 10 μL de sêmen *in natura* em 4,0 mL de água destilada, obtendo-se a diluição de 1:400.

5.3.2. Procedimento para a congelação do sêmen

Os ejaculados selecionados para a congelação foram diluídos no meio Glicina Gema Leite – GGL (GONZALEZ et al, 1996), conforme as etapas abaixo, obtendo-se a concentração final de 400×10^6 espermatozóides/mL.

- 1ª etapa

Após a determinação da concentração espermática realizava-se o cálculo do rendimento do número de doses do ejaculado assim como o volume total necessário para proceder-se a diluição, considerando-se que cada dose possuía uma concentração de 100×10^6 espermatozóides envasados em palhetas francesas de 0,25 mL.

- 2ª etapa

Após o cálculo do volume final, diluía-se o sêmen *in natura* com o meio diluente GGL sem o crioprotetor glicerol (Meio 1 – Anexo I, item 9.1), perfazendo essa soma 50% do volume final.

- 3ª etapa

Após essa primeira diluição, procedia-se à avaliação da motilidade convencional em microscopia óptica, visando averiguar possíveis interações desfavoráveis.

Em seguida, adicionava-se 50% do meio diluente GGL com o crioprotetor glicerol (Meio 2 – Anexo I, item 9.1), obtendo-se o volume total final necessário para o envase das doses.

Durante as etapas de diluição do sêmen (2ª e 3ª etapa), a amostra e os meios diluentes foram mantidos em banho-maria a 32° C.

- 4ª etapa

Ao término do envase, as palhetas francesas de 0,25 mL foram dispostas no cilindro porta-palhetas do sistema Tetakon - TK 3000^{®6}, previamente aquecido a 32°C, temperatura estabelecida como inicial para todos os procedimentos de criopreservação conforme descrito por Rodello (2006). Depois de preenchido, o cilindro foi acoplado à unidade de resfriamento, ficando na posição vertical.

O sistema foi programado para executar uma curva de refrigeração a 0,25°C/minuto até 5°C, sendo as palhetas mantidas nessa temperatura até completar 120 minutos do início da refrigeração (RODELLO, 2006).

A etapa de congelação foi iniciada transferindo-se o cilindro contendo as palhetas para a caixa térmica recipiente, contendo aproximadamente dois litros nitrogênio líquido (N2L), e acionando-se o início da curva de congelação

6 TK Tecnologia em Congelação LTDA

automatizada pré programada, correspondente a uma velocidade de $-20^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até atingir a temperatura de -120°C .

Ao final do procedimento, as palhetas foram imersas em N₂L, raqueadas e armazenadas em botijão criogênico a -196°C até a sua descongelação e análise.

5.3.3. Descongelação das amostras

O procedimento de descongelação das amostras ocorreu, em média, aproximadamente 30 dias após sua congelação.

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 40°C por 20 segundos (SOUSA et al., 1999) sendo o sêmen acondicionado em tubos eppendorfs de 1,5 mL previamente aquecidos e mantidos em banho-maria seco a 37°C .

Previamente ao início das avaliações, uma alíquota de 25 μL do sêmen congelado foi diluída em 500 μL de meio X-Cell[®] visando a obtenção de uma amostra com aproximadamente 50×10^6 espermatozóides.

5.3.4. Avaliação das amostras descongeladas

Procederam-se, após aproximadamente cinco minutos da diluição, as avaliações das amostras descongeladas utilizando-se:

- Análise Computadorizada do Movimento Espermático⁷ (CASA) utilizando-se o *hardware* IVOS (*Integrat ed Visual Optical System* – Sistema Visual de Integração Óptica) versão 12.3 da empresa *Hamilton Thorne Biosciences*

⁷ HTMA-IVOS 12.3 – Hamilton Research - Beverly, MA, USA

constituído com o *software Animal Breeders*, configurado com *setup* recomendado pelo fabricante para carneiros conforme descrito no Anexo I - 9.3, o qual é executado na plataforma Windows XP®.

Uma alíquota de 6 µL da amostra a ser analisada foi disposta em câmara de Makler⁸ previamente aquecida a 37° C, da qual avaliaram-se, em três campos, os parâmetros da cinética espermática descritos a seguir. Os campos foram selecionados automaticamente sempre a partir do ponto central da câmara, observando-se a inexistência de artefatos como bolhas, partículas ou outros elementos que pudessem prejudicar a avaliação (VARNER et al., 1991; VULCANO et al., 1998; SOUSA et al, 1999; FERREIRA 2000; SOUSA, 2002):

- | | |
|--|--------------|
| • Motilidade Total (<i>Total Motility</i> , %) | MT |
| • Motilidade Progressiva (<i>Progressive Motility</i> , %) | MP |
| • Velocidade de Trajeto (<i>Path Velocity</i> , µm/s) | VAP |
| • Velocidade Progressiva (<i>Progressive Velocity</i> , µm/s) | VSL |
| • Velocidade Curvilinear (<i>Track Speed</i> , µm/s) | VCL |
| • Amplitude Lateral da Cabeça (<i>Lateral Amplitude</i> , µm) | ALH |
| • Frequência de Batimentos (<i>Beat Frequency</i> , Hz) | BCF |
| • Retilinearidade (<i>Straightness</i> , %) | STR |
| • Linearidade (<i>Linearity</i> , %) | LIN |
| • Elongação (<i>Elongation</i> , %) | ELONG |
| • Células com Velocidade Rápida (<i>Rapid Cell</i> , %) | RAPID |

8 Makler Counting Chamber. Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel

• Células com Velocidade Média (<i>Medium Velocity Cell</i> , %)	MEDIUM
• Wobble (VAP/VCL x 100 - %)	WOB
• Dance (VCL x ALH - μm^2)	DANCE

Os parâmetros da cinética espermática VCL, VAP, VSL, ALH, BCF, LIN, STR e ELONG também foram registrados de forma individualizada para cada espermatozóide constituinte da população total média.

A) Associação das sondas fluorescentes iodeto de propídeo, aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com o isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e JC-1 (CELEGHINI, 2005 adaptada por AZEVEDO, 2006).

O sêmen congelado/ descongelado dos 26 carneiros da raça Santa Inês foi submetido à técnica de avaliação simultânea da integridade de membrana plasmática, reação acrossomal e potencial de membrana mitocondrial conforme descrição de Celeghini (2005) e adaptada para o sêmen ovino por Azevedo, (2006).

Para isso, uma alíquota de 50 μL do sêmen foi diluída em 450 μL de meio X-Cell® pré-aquecido a 37°C mantendo-se a concentração aproximada de 4×10^6 espermatozoides/mL. Posteriormente, foram adicionadas as soluções de trabalho das sondas fluorescentes (Anexo I - 9.2.1, 9.2.2, 9.2.5), conforme descrito a seguir:

- 1,5 µL da solução de trabalho de iodeto de propídio (IP);
- 1,5 µL da solução de trabalho de iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'- tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) e;
- 25 µL da solução de trabalho da aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA).

A mistura foi homogeneizada, mantida protegida da luz e submetida à incubação (37° C) por aproximadamente 8 a 10 minutos. Após esse período, uma amostra de aproximadamente 10µL foi retirada e colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas (37° C) para realização da leitura e contagem de 100 células sob imersão e aumento de 1000 vezes em microscópio com iluminação epifluorescente⁹, usando o filtro I3 (Excitação BP 450-490 e Supressão LP 515).

Nesta avaliação os espermatozóides foram distribuídos em 8 categorias, de acordo com a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial, pela associação das sondas iodeto de propídeo, aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com o isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e JC-1 (CELEGHINI, 2005 adaptada por AZEVEDO, 2006) da seguinte maneira:

- ❖ A presença ou ausência de fluorescência vermelha na cabeça indicada pela sonda IP, evidenciou respectivamente a lesão ou não da membrana plasmática.

⁹ Leica DMLB - Leica Microsystems - Leitz – Alemanha

- ❖ A presença ou ausência de fluorescência verde intenso no acrossoma indicada pela sonda FITC-PSA, evidenciou respectivamente a lesão ou não do acrossoma.
- ❖ As fluorescências vermelha e verde da peça intermediária indicadas pela sonda JC-1 evidenciaram, respectivamente, alto e baixo potencial de membrana mitocondrial.

Membrana Plasmática	Acrossomo	Potencial de membrana	Categoria
Intacta	Intacto	Alto →	1
		Baixo →	2
	Lesado	Alto →	3
		Baixo →	4
Lesada	Intacto	Alto →	5
		Baixo →	6
	Lesado	Alto →	7
		Baixo →	8

B) Associação das sondas iodeto de propídeo, aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com o isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e *Mitotracker Green* FM (CELEGHINI, 2005 adaptada).

Amostras não pareadas do sêmen congelado/descongelado dos 26 carneiros foram submetidas à técnica adaptada de avaliação simultânea da integridade de membrana plasmática, reação acrossomal e potencial de membrana mitocondrial conforme descrição de Celeghini (2005).

Diluiu-se uma alíquota de 50 µL do sêmen em 450 µL de meio X-Cell® pré-aquecido a 37°C mantendo-se a concentração aproximada de 4×10^6 espermatozóides/mL.

Posteriormente, foram adicionadas as soluções de trabalho das sondas fluorescentes (Anexo I - 9.2.1, 9.2.2, 9.2.4), conforme descrito abaixo:

- 1,5 µL da solução de trabalho de iodeto de propídio (IP);
- 1,5 µL da solução de trabalho de *Mitotracker Green* FM (MITO) e;
- 25 µL da solução de trabalho da aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA).

Semelhante a técnica anterior, a mistura foi homogeneizada, mantida protegida da luz e submetida à incubação (37° C) por aproximadamente 8 a 10 minutos. Após esse período, 10µL da amostra foram colocados entre lâmina e lamínula pré-aquecidas (37° C), para realização da leitura e contagem de 100

células sob imersão e aumento de 1000 vezes, em microscópio com iluminação epifluorescente¹⁰, usando o filtro I3 (Excitação BP 450-490 e Supressão LP 515).

Os espermatozóides foram classificados em 8 categorias conforme a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial pela associação das sondas iodeto de propídeo, aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com o isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e MITO (CELEGHINI, 2005 adaptada):

- ❖ A presença ou ausência de fluorescência vermelha na cabeça indicada pela sonda IP, evidenciou, respectivamente, a lesão ou não da membrana plasmática.
- ❖ A presença ou ausência de fluorescência verde intenso no acrossoma indicada pela sonda FITC-PSA, evidenciou, respectivamente, a lesão ou não do acrossoma.
- ❖ As fluorescências verde brilhante e verde fosco (“apagado”) da peça intermediária indicada pela sonda MITO evidenciaram, respectivamente, com e sem potencial de membrana mitocondrial.

10 Leica DMLB - Leica Microsystems - Leitz – Alemanha

Membrana Plasmática	Acrossomo	Potencial de membrana	Categoria
Intacta	Intacto	Com	1
		Sem	2
	Lesado	Com	3
		Sem	4
Lesada	Intacto	Com	5
		Sem	6
	Lesado	Com	7
		Sem	8

C) Associação das sondas iodeto de propídeo, aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com o isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e Rodamina 123 (CELEGHINI, 2005 adaptada).

Amostras não pareadas do sêmen congelado/descongelado foram submetidas à técnica adaptada de avaliação simultânea da integridade de membrana plasmática, reação acrossomal e potencial de membrana mitocondrial conforme descrição de Celeghini (2005).

Uma alíquota de 50 µL do sêmen foi diluída em 450 µL de meio X-Cell® pré-aquecido a 37°C mantendo-se a concentração aproximada de 4×10^6 espermatozóides/mL.

A seguir, foram adicionadas as soluções de trabalho das sondas fluorescentes (Anexo I - 9.2.1, 9.2.2, 9.2.3) conforme citado abaixo:

- 1,5 µL da solução de trabalho de iodeto de propídio (IP);
- 1,5 µL da solução de trabalho de Rodamina 123 (R-123) e;
- 25 µL da solução de trabalho da aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA).

Semelhante às técnicas anteriores, a mistura foi homogeneizada, mantida protegida da luz e submetida à incubação (37° C) por aproximadamente 30 minutos. Após esse período, 10µL da amostra foram colocados entre lâmina e lamínula pré-aquecidas (37° C) para realização da leitura e contagem de 100 células sob imersão e aumento de 1000 vezes em microscópio com iluminação epifluorescente¹¹, usando o filtro I3 (Excitação BP 450-490 e Supressão LP 515).

Houve a classificação dos espermatozóides em oito categorias conforme a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial pela associação das sondas iodeto de propídeo, aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com o isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e R-123 (CELEGHINI, 2005 adaptada):

- ❖ A presença ou ausência de fluorescência vermelha na cabeça indicada pela sonda IP, evidenciou, respectivamente, a lesão ou não da membrana plasmática.

11 Leica DMLB - Leica Microsystems - Leitz – Alemanha

- ❖ A presença ou ausência de fluorescência verde intenso no acrossoma indicada pela sonda FITC-PSA, evidenciou, respectivamente, a lesão ou não do acrossoma.
- ❖ As fluorescências verde intenso e verde fosco (“apagado”) da peça intermediária indicada pela sonda R-123 evidenciaram, respectivamente, com e sem potencial de membrana mitocondrial.

Membrana Plasmática	Acrossomo	Potencial de membrana	Categoria
Intacta	Intacto	Com	1
		Sem	2
	Lesado	Com	3
		Sem	4
Lesada	Intacto	Com	5
		Sem	6
	Lesado	Com	7
		Sem	8

5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A metodologia estatística utilizada foi análise Exploratória de Dados, Estatísticas Descritiva, Gráficos e Técnicas Multivariadas:

- Análise Fatorial com método de rotação VARIMAX e
- Análise de Agrupamentos com método de Ward (JOHNSON e WICHERN, 1992; HAIR Jr. et al., 2005; MOORE, 2005).

O software estatístico empregado foi o Minitab, versão 14.

Os valores dos parâmetros analisados foram padronizados de forma a permitir o uso de uma mesma unidade de medida, visto que os parâmetros empregados possuem as mais variadas unidades, entre elas %, μm , $\mu\text{m/s}$, Hz. Para isso empregou-se a fórmula: $X - \bar{X} / dp$, onde X = valor individual referente ao parâmetro, $\bar{X}$ = média da população do parâmetro e dp = desvio padrão da amostra.

A rotação é um método estatístico que ajuda na interpretação da importância de cada fator principal no peso da matriz fatorial (NÚÑEZ-MARTÍNEZ et al., 2006).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo geral, os procedimentos estatísticos realizados neste experimento foram a classificação/agrupamento obedecendo a um padrão não hierárquico seguido de um hierárquico, de forma similar ao discutido em Martinez-Pastor et al., (2005); Núñez-Martínez et al., (2006).

Quanto à adequação dos dados para avaliação, Martinez-Pastor et al., (2005) procederam análise similar, padronizando os valores dos parâmetros, Converteram resultados não padronizados dos parâmetros altamente correlacionados, em dados padronizados, os quais representaram uma combinação linear.

A análise prévia do sêmen *in natura*, após a clarificação no meio X-Cell®, do ejaculado dos 26 carneiros evidenciou os valores apresentados na Tabela 1.

Carvalho et al., (2002) avaliando especificamente carneiros da raça Santa Inês na região sudeste do Brasil, no Estado do Rio de Janeiro, verificaram valores médios e desvio padrão de volume, motilidade progressiva, vigor e concentração espermática de $1,18 \pm 0,49$ mL; $68,44 \pm 9,4$ %; $3,9 \pm 0,17$ e $5,17 \pm 1,09 \times 10^9$, respectivamente. Frente a essas observações e conforme citado por Boundy (1993), Henry e Neves (1996) e Karagiannidis et al., (2000), o sêmen utilizado para as congelações encontrava-se dentro dos padrões esperados para a espécie e para a raça.

TABELA 1: Valores médios $\pm$ dp e amplitude de variação dos parâmetros do sêmen *in natura*, clarificado no meio X-Cell[®], de ovinos da raça Santa Inês utilizados para a congelação (n=26)

Parâmetros	Média $\pm$ dp	Amplitude de variação
Volume (mL)	1,6 $\pm$ 0,8	0,8 - 3,1
Motilidade convencional (%)	88,5 $\pm$ 4,6	80 - 95
Vigor (0-5)	4,8 $\pm$ 0,5	3 - 5
Concentração ($\times 10^6$ /mL)	3832,0 $\pm$ 1615,3	1170 - 7600

dp - Desvio padrão

Devido ao número de animais atender ao planejamento estatístico, optou-se pela congelação de apenas um ejaculado de cada animal, que ocorreu após o período de nivelamento biológico. Windsor (1997) trabalhando com sêmen congelado de carneiros, relatou não existir diferenças na fertilidade após a inseminação artificial cervical entre os ejaculados do mesmo animal, o que não ocorre entre os carneiros.

Após as descongelações, as amostras foram analisadas pelo sistema CASA, sendo verificados valores médios, desvios padrão e amplitude de variação dos parâmetros, avaliados conforme a Tabela 2.

Neste experimento, o procedimento de diluição fez-se necessário para adequação da concentração espermática para possibilitar a análise computadorizada do movimento espermático e prevenir o cruzamento das trajetórias dos espermatozóides (FERREIRA, 2000; SOUSA, 2002; MAIA, 2006). Segundo Verstegen et al., (2002) em uma alta concentração, as células com movimento rápido poderiam ser excluídas da análise devido a colisões, e serem

retiradas da área de avaliação, ou devido ao efeito exercido pelas células vizinhas a ela.

TABELA 2: Valores médios, desvios padrão e amplitude de variação dos parâmetros da cinética espermática avaliadas no sistema computadorizado de análise do movimento espermático CASA – HTM-IVOS (versão 12,3) das amostras (n=26) de sêmen de ovinos congelado/descongelado no meio Glicina Gema Leite e clarificados no meio X-Cell®

Parâmetros	Média	Desvio padrão	Amplitude de variação
MT (%)	47,3	22,9	5,0 – 90,0
MP (%)	19,5	13,5	0 – 53,0
RAPID (%)	28,7	19,1	0 – 70,0
MEDIUM (%)	18,6	6,9	5,0 – 30,0
VCL (µm/s)	166,3	30,4	82,1 – 225,4
VAP (µm/s)	103,4	27,9	39,6 – 150,8
VSL (µm/s)	82,4	27,2	23,3 – 130,8
ALH (m/s)	6,5	2,1	0 – 9,1
BCF (Hz)	34,5	2,8	28,1 – 39,3
STR (%)	70,0	6,0	60,0 – 83,0
LIN (%)	45,5	8,8	28,0 – 60,0
WOB	0,6	0,1	0,3 – 0,7
DANCE (µm ²)	13,4	5,3	0 – 21,9

MT - Motilidade total; MP - Motilidade progressiva; RAPID - Células com Velocidade Rápida; MEDIUM - Células com Velocidade MÉDIA VCL - Velocidade de deslocamento real dos espermatozóides; VAP - Velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme desprezando-se o deslocamento lateral da célula espermática; VSL - Velocidade retilínea considerando-se a trajetória espermática uma reta; ALH - Deslocamento lateral de cabeça; BCF - Frequência de batimento; LIN - Linearidade; STR - Índice retilíneo do movimento espermático; Wob - Wobble – (VAP/VCL) x 100; DANCE - VCL x ALH.

A versão 12.3 do sistema CASA HTM-IVOS da *Hamilton Thorne Biosciences* possui um programa denominado anti-colisão (AC), que permite amenizar essa ocorrência. Contudo, optou-se por proceder a diluição, ajustando a concentração espermática para aproximadamente 50×10^6 espermatozóides, visto

que a análise individual da cinética dos espermatozóides tornou-se uma das metas metodológicas neste experimento.

Concentrações superiores não permitiram uma análise correta das amostras, sendo muitas vezes, até mesmo rejeitadas automaticamente para a avaliação.

Rodello (2006), que ao congelar sêmen de carneiros da raça Santa Inês em sistema automatizado (TK 3000[®]) utilizando-se do meio diluente Glicina Gema Leite, obteve valores médios de MT, MP, VCL e LIN de $50,3 \pm 11,7$ %; $29,1 \pm 8,8$ %; $105,2 \pm 8,6$ $\mu\text{m/s}$ e $80,0 \pm 4,4$ %. Tais diferenças possivelmente são decorrentes do efeito animal e de interações entre o meio de criopreservação e os de clarificação.

Para proceder essas avaliações, as amostras foram previamente clarificadas no meio comercial X-Cell[®], enquanto Rodello (2006) empregou a fração sem glicerol do meio Glicina Gema Leite.

Uma grande influência da concentração espermática nos resultados fornecidos pelo sistema CASA também foi relatada por Verstegen et al., (2002). Esses pesquisadores ressaltaram o cuidado no processamento ao clarificar com meios que não contenham partículas com tamanho similar às cabeças dos espermatozóides, tais como alguns meios com gema de ovo ou com leite integral, evitando que elas sejam analisadas como espermatozóides imóveis.

Rijsselaere et al. (2003) ao compararem o efeito de diferentes meios de clarificação tais como, Hepes-TALP, fluido prostático, meio TRIS gema de ovo e

Solução salina fisiológica, sobre a cinética do sêmen de cães verificaram diferenças significativas nos parâmetros avaliados, com exceção do STR.

Corroborando com essas informações, Mortimer e Maxwell (2004) verificaram diferenças na cinética dos espermatozóides congelados de carneiros com a adição do meio PBS, de plasma seminal e de plasma seminal artificial.

Atribui-se um menor valor do parâmetro LIN à viscosidade dos meios usados para a clarificação, pois segundo Mortimer (1997), um aumento na viscosidade do meio pode alterar o padrão de movimentação, reduzindo a amplitude do movimento. Contudo, Mortimer e Maxwell (2004), analisando sêmen de ovinos congelados e diluídos no meio PBS, plasma seminal e plasma seminal artificial, atribuem as mudanças no padrão de movimentação espermática ao efeito direto da interação entre os efeitos da criopreservação, meio para clarificação e a conseqüente capacitação espermática.

Houve uma grande amplitude de variação no parâmetro ALH, parâmetro citado na literatura humana por Auger et al., (1989) como indicador do movimento de hiper-ativação característico da capacitação espermática. Vulcano et al., (1998) reiteraram essa afirmação, pois em estudo com sêmen hiperativado de ovinos, encontraram os parâmetros ALH, VCL, WOB e LIN como principais indicadores desta condição, criando, a partir deles, um modelo matemático explicativo da hiperativação, com índice de 94% de acerto.

Mortimer e Maxwell (1999) definiram como valores indicativos da hiperativação do semen ovino $VCL > 250,0 \mu\text{m/s}$; $VSL \leq 100 \mu\text{m/s}$; $LIN \leq 30\%$ e $ALH > 9,0 \mu\text{m}$.

A escolha de três campos para a análise computadorizada do movimento espermático baseou-se nos achados de Varner et al., (1991) que concluíram não haver diferença significativa entre avaliações de três a sete campos. Só o primeiro campo foi selecionado pelo observador, estando freqüentemente no centro da câmara de Makler[®]. Os demais foram “escaniados” automaticamente pelo sistema computadorizado, seguindo assim as indicações de Anzar et al., (1991) e Sousa (2002). Este procedimento de análise de três campos aleatórios também tem a função de verificar a homogeneidade da amostra.

Ao avaliar-se o valor dos desvios padrão dos parâmetros da cinética espermática fornecido pelo sistema CASA ao término da análise (TAB. 2), conclui-se que, apesar da amplitude existente, houve uniformidade nos campos analisados das amostras.

Esta verificação foi determinada ao ser calculado o desvio padrão, a partir dos desvios obtidos após a verificação dos três campos de análise, e calculados pelo sistema CASA para cada parâmetro da cinética espermática (TAB. 3).

Atribui-se a amplitude dos valores dos desvios padrão resultantes da avaliação da cinética espermática à presença de sub-populações de espermatozóides na amostra total avaliada.

Para Verstegen et al., (2002), as maiores variações são observadas na análise de diferentes campos do que em repetições do mesmo campo, tanto quanto maior for o número de células analisadas, menor o coeficiente de variação. Conseqüentemente, a precisão dos resultados aumenta com o incremento do número de campos e de células analisadas.

TABELA 3: Desvios padrão dos parâmetros da cinética espermática do sêmen congelado de 26 carneiros da raça Santa Inês determinados em três campos de análise pelo Sistema de Análise Computadorizada do Movimento Espermático – CASA HTM-IVOS versão 12.3

Animal	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
	($\mu\text{m/s}$)	($\mu\text{m/s}$)	($\mu\text{m/s}$)	(μm)	(Hz)	(%)	(%)
1	66,7	66,4	93,8	2,3	20,2	26,0	26,0
2	21,9	16,1	81,1	0,0	16,2	19,0	20,0
3	63,3	68,7	63,0	3,6	17,7	27,0	31,0
4	49,3	48,9	57,7	2,2	22,0	26,0	30,0
5	73,8	77,8	80,7	3,1	16,1	28,0	29,0
6	59,0	53,4	81,1	3,1	18,3	25,0	22,0
7	58,7	59,3	79,0	4,4	19,0	25,0	25,0
8	59,3	58,6	77,5	3,1	23,3	27,0	26,0
9	63,2	63,1	77,7	3,7	20,5	25,0	27,0
10	77,5	83,4	75,2	3,6	19,5	27,0	32,0
11	69,1	72,2	81,8	3,5	19,4	25,0	29,0
12	75,5	79,9	84,1	3,0	16,1	27,0	31,0
13	17,3	12,1	45,0	0,0	20,2	25,0	24,0
14	58,0	57,1	73,9	3,0	16,9	25,0	28,0
15	65,9	70,2	72,9	4,5	18,0	26,0	29,0
16	56,6	58,1	69,9	3,9	18,9	26,0	27,0
17	74,6	78,5	83,0	3,5	18,7	27,0	29,0
18	70,1	76,1	84,6	3,6	17,6	26,0	24,0
19	74,2	75,5	87,8	3,8	19,6	27,0	28,0
20	59,4	58,2	88,3	2,7	18,1	25,0	22,0
21	80,0	84,7	78,0	3,5	19,1	27,0	32,0
22	78,9	81,7	74,1	3,1	16,4	24,0	31,0
23	63,0	68,5	73,5	3,2	14,5	22,0	25,0
24	73,9	78,5	76,3	2,6	13,4	24,0	28,0
25	75,5	77,0	90,0	3,8	19,5	26,0	28,0
26	65,1	66,6	85,0	3,8	19,6	25,0	24,0
dp	15,4	18,2	10,4	1,1	2,2	1,8	3,2

VCL - Velocidade de deslocamento real dos espermatozoides; VAP - Velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme desprezando-se o deslocamento lateral da célula espermática; VSL - Velocidade retilínea considerando-se a trajetória espermática uma reta; ALH - Deslocamento lateral de cabeça; BCF - Frequência de batimento; LIN - Linearidade; STR - Índice retilíneo do movimento espermático. dp – desvio padrão dos desvios.

A análise da combinação das sondas fluorescentes é apresentada na

Tabela 4.

TABELA 4: Frequências (%) quantitativa e qualitativa da distribuição por categorias dos espermatozóides de 26 carneiros, após o processo de congelação/dcongelação, avaliados em microscopia epifluorescente, por diferentes combinações de sondas fluorescentes: IP (iodeto de propídeo); FITC-PSA (aglutinina *Pisum sativum*) e JC-1 (**J-agregados**), MITO (**Mitotracker Green FM**), R-123 (**Rodamina 123**)

Combinação de Sondas	Frequência por categorias							
	1	2	3	4	5	6	7	8
IP, FITC-PSA e JC-1 (%)	1,46	48,85	0,12	0,46	0,19	22,83	0,27	25,83
IP, FITC-PSA e MITO (%)	4,00	29,03	0,27	1,85	26,34	16,26	14,92	7,34
IP, FITC-PSA e R-123 (%)	12,88	16,53	3,81	14,73	17,84	1,27	28,91	4,04

IP, FITC-PSA e JC-1 – Frequência Quantitativa

1. Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial; 2. Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com baixo potencial de membrana mitocondrial; 3. Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e com alto potencial de membrana mitocondrial; 4. Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e com baixo potencial de membrana mitocondrial; 5. Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial; 6. Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com baixo potencial de membrana mitocondrial; 7. Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com alto potencial de membrana mitocondrial; 8. Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com baixo potencial de membrana mitocondrial

IP, FITC-PSA e MITO e IP, FITC-PSA e R-123 – Frequência Qualitativa

1. Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com potencial de membrana mitocondrial; 2. Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e sem potencial de membrana mitocondrial; 3. Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e com potencial de membrana mitocondrial; 4. Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e sem potencial de membrana mitocondrial; 5. Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com potencial de membrana mitocondrial; 6. Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e sem potencial de membrana mitocondrial; 7. Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com potencial de membrana mitocondrial; 8. Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial de membrana mitocondrial

De maneira semelhante ao citado por Garner et al., (1997), o duplo sistema de coloração utilizando o IP mais as sondas R-123, JC-1 ou MITO, permitiu a identificação de populações de espermatozóides com mitocôndrias metabolicamente ativas, uma população de espermatozóides mortos e de espermatozóides moribundos. O núcleo dos espermatozóides mortos com as membranas degeneradas fluoresceu em vermelho com o IP. As mitocôndrias ativas dos espermatozóides apresentaram a fluorescência verde com a combinação de sondas MITO e R-123 ou verde a vermelho-alaranjado com a JC-1. As células moribundas exibiam cabeças vermelhas com mitocôndrias verdes.

Utilizando o teste de homogeneidade qui quadrado (χ^2), não se verificou uma relação entre os testes de avaliação conjunta do potencial da membrana

mitocondrial JC-1, MITO e R-123, sendo verificado para JC-1 vs MITO, $\chi^2 = 1517,8$ e $P = 0,00^+$; para JC-1 vs R-123, $\chi^2 = 3203,0$ e $P = 0,00^+$ e para MITO vs R-123, $\chi^2 = 1083,8$ e $P = 0,00^+$. Considerando-se que os testes MITO e R-123 são qualitativos, também foi realizado o teste de correlação, sendo obtido um coeficiente de correlação igual a 0,369 e o valor de $P = 0,368$.

Com a análise individual dos testes, levantaram-se as seguintes hipóteses para os resultados.

A prova JC-1 é de grande valia para a classificação de uma sub-população de espermatozóides, ou seja, as células com alto potencial de membrana mitocondrial, conforme relatado por Garner et al., (1997). Contudo, quando se utiliza a microscopia epifluorescente, verifica-se tratar de uma prova elitista, pois somente aquelas que atingem um limiar de potencial, serão enquadradas nessa categoria. Nesse estudo, foi verificada uma sub-população com alto potencial de membrana mitocondrial inferior a 5%. De acordo com Celeghini (2005), após o processo de criopreservação do sêmen bovino, menos de 1% dos espermatozóides corados por JC-1 apresentou J-agregados (alto potencial de membrana mitocondrial).

Todas as demais células espermáticas entram na categorização das células com baixo potencial de membrana mitocondrial. O limiar baixo possui uma grande amplitude, permitindo até mesmo a exclusão de uma sub-população de espermatozóides, as células sem potencial mitocondrial, havendo assim uma possibilidade de equívoco na categorização final da amostra.

Segundo Papaioannou et al., (1997), com o uso da citometria de fluxo, além da possibilidade de ampliar a amostra, pois um número maior de células poderia ser analisado, haveria uma maior sensibilidade na detecção da emissão da fluorescência.

Para Cossarizza et al., (1993), o estudo do potencial da membrana mitocondrial com a citometria de fluxo apresentava grandes vantagens, pois com ele havia a possibilidade de avaliar a heterogeneidade da população celular formadora da amostra, além de permitir uma análise qualitativa (emissão da fluorescência verde a alaranjada) e quantitativa (intensidade da fluorescência pura) das variações do potencial da membrana mitocondrial nas células vivas.

Tal situação pode não ocorrer com a avaliação subjetiva realizada pelo olho humano nas avaliações em microscopia epifluorescente, na qual apenas um número limitado de células é avaliado, havendo também a influência direta da acuidade visual do examinador.

Conforme Marchetti et al., (2004), a interpretação e a avaliação das mudanças do $\Delta\psi_m$ podem ser, às vezes, confusas devido a variações substanciais entre as sondas, dependendo da susceptibilidade ao meio que envolve a análise.

No que diz respeito à motilidade e à atividade mitocondrial, verificou-se uma baixa correlação entre elas nas três provas (JC-1, MITO e R-123). Connell et al., (2002) observaram fato similar, no qual a associação entre os parâmetros de cinética, exceto ALH, e a função mitocondrial determinada pela sonda R-123,

foram diminuindo após a criopreservação, sugerindo que nem todas as células dentro da amostra são uniformemente lesadas pelo processo de congelamento.

Papaioannou et al., (1997), em seu estudo com espermatozóides humanos encontraram uma grande quantidade de células mortas que emitiam fluorescência R-123 moderada, e atribuíram esse fato à coloração inespecífica em toda a célula, principalmente na cabeça. Presumivelmente, as células mortas não retêm a capacidade de acumular a R-123 e seus citoplasmas estão corados uma vez que uma quantidade excessiva de corante pode permear pela membrana plasmática lesada.

Em touros, Garner et al., (1997) verificaram que a porcentagem de espermatozóides móveis foi maior que a porcentagem de mitocôndrias fluorescentes coradas com as sondas JC-1, MITO ou R-123 e atribuíram essa discrepância à falha humana, aparentemente superestimando a porcentagem de espermatozóides com motilidade.

No presente experimento, buscou-se minimizar essa subjetividade com o uso da análise computadorizada do movimento espermático, empregando o *Setup* para a espécie ovina fornecido pela empresa *Hamilton Thorne Biosciences*, fabricante do sistema CASA HTM-IVOS versão 12.3 (Anexo I – 9.3).

Ainda, segundo Garner et al., (1997), é possível que a fluorescência mitocondrial desapareça ou falhe em fluorescer em níveis muito baixos, enquanto que os espermatozóides continuam a exibir uma motilidade progressiva, muito embora, relativamente menor.

Nos estudos de Meseguer et al., (2004a) no sêmen humano congelado, a atividade mitocondrial avaliada pela sonda *Mitotracker Green* não foi inicialmente

correlacionada com os demais parâmetros por eles avaliados, incluindo a motilidade. Desta forma, a atividade mitocondrial não pareceu ser um marcador representativo para a motilidade progressiva.

Desta constatação decorre a necessidade da compreensão das subpopulações de espermatozóides existentes no ejaculado.

Em relação ao sistema CASA, após a análise estatística descritiva convencional, na qual o valor utilizado freqüentemente é a média dos parâmetros, optou-se por considerar os parâmetros da cinética de cada espermatozóide individualmente. Desta forma, utilizou-se o espermatozóide como variável, ampliando o universo amostral de 26 médias para 5834 espermatozóides analisados individualmente quanto aos parâmetros de sua cinética e trajetória.

O número de espermatozóides analisados poderia ser superior, visto que, este n, representa apenas os dados computados no último dos três campos avaliados no sistema CASA. Tal fato decorreu do sistema CASA ter sido programado para a análise automática dos três campos, visto que não se desejou nenhuma interferência na avaliação, e a opção *EDIT/SORT*¹² estar disponível apenas para o último campo analisado.

Para o fornecimento dos dados médios como ocorre na maneira usual, não se verificam problemas quanto à captura e processamentos dos dados. Contudo, para a análise individual dos espermatozóides, decorrentes da avaliação dos três campos, dever-se-ia utilizar o comando *ADD SCAN*, garantindo e ampliando a população avaliada a ser editada.

12 System Options Guide Version 12.3, Hamilton Thorne Biosciences, chapter 1:Edit Tracks, 2005

Abaigar et al., (1999) realizaram estudo empregando esse conceito no qual avaliaram 3208 espermatozóides *in natura* de cachacos e 7278 espermatozóides congelados de gazelas. Abaigar et al., (2001) corroboraram essa metodologia com a análise de 30511 espermatozóides *in natura* de gazelas. Mortimer e Maxwell (2004), trabalharam com 2099 células criopreservadas de carneiros. Quintero-Moreno et al., (2004;), com 6297 espermatozóides refrigerados de cachacos. E Nuñez-Martínez et al., (2006), com 3463 observações para o sêmen canino *in natura* e 5663, para o congelado. Segundo esses autores, apesar de muitos estudos já publicados utilizarem o sistema CASA, alguns resultados mostraram-se desapontadores ou pouco informativos, provavelmente devido a uma análise inadequada dos dados multivariados, os quais são apresentados apenas como médias $\pm$ desvios ou erros padrão, baseando essa análise em uma avaliação paramétrica.

Desta forma, as sub-populações que sofrem ação do tratamento ou aquelas onde nada se verifica, podem interferir diretamente nos resultados médios dos tratamentos avaliados nos experimentos.

Valorizando essa forma de avaliação, Abaigar et al., (1999), baseados na distribuição bimodal e com o alto desvio associado com marcantes extensões dos dados, refletiram a presença de sub-populações na amostra global. Essas extensões tendem a mascarar os efeitos do tratamento se os parâmetros forem examinados individualmente, devido ao desvio padrão alto não permitir sua detecção por testes baseados apenas na variância.

Situação similar pode ser verificada ao analisar a Tabela 2, na qual existe alta dispersão dos valores, indicada pela amplitude de variação dos dados.

Com essa nova forma de registro da avaliação pode-se verificar a cinética individual dos espermatozóides, obtendo-se uma resposta multivariada, pois a análise computadorizada do movimento espermático fornece informações para um grande conjunto de variáveis entre elas, VAP; VSL; VCL; ALH; BCF; STR; LIN; SIZE; ELONG, sendo os dados fornecidos diretamente pelo computador como valores médios (tradicional) ou individuais (nova proposta). Tal idéia vem ganhando espaço na análise de dados dos experimentos com espermatozóides (MORTIMER, 1997; ABAIGAR, et al., 1999; ABAIGAR, et al., 2001; VERSTEGEN et al., 2002; QUINTERO-MORENO et al., 2003; MORTIMER e MAXWELL, 2004; AMANN e KATZ, 2004; NÚÑEZ-MARTINEZ et al., 2006).

Neste estudo, o menor número de observações foi para o carneiro número 2, com sete espermatozóides enquanto o animal de número 26 teve o maior número de observações, com 749 espermatozóides. Em média foram analisadas 224 células por animal.

Após avaliação das três provas determinantes da categoria espermática, baseadas no potencial de membrana mitocondrial, houve a redução para apenas a prova com a combinação MITO.

Isto ocorreu devido à prova com a combinação JC-1 mostrar-se elitista para os objetivos do presente estudo, selecionando apenas uma pequena população celular possuidora de alta atividade mitocondrial, segregando as demais para um conjunto denominado baixo potencial.

A prova com a combinação da sonda R-123 pode ter sofrido a ação do período de incubação de 30 minutos, o qual é inerente à metodologia. Tal condição pode gerar uma aceleração do processo de capacitação espermática, culminando com a reação acrossomal, visto que a maior porcentagem de espermatozóides lesionados foi verificado neste teste de combinação de sondas fluorescentes, detectados pelas categorias: 3. Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e com potencial de membrana mitocondrial; 4. Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e sem potencial de membrana mitocondrial; 7. Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com potencial de membrana mitocondrial e 8. Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial de membrana mitocondrial (TAB. 4). Na Tabela 5 é evidenciado um resumo descritivo das alterações, considerando-se os domínios das membranas.

O fenômeno da capacitação espermática é marcado pelo início dos eventos de desestabilização da membrana, os quais eventualmente poderiam levar a célula à morte (MORTIMER, 1997).

Pérez et al., (1997) avaliaram a incubação do sêmen *in natura* de ovinos à temperatura ambiente, verificando que uma sub-população dentro da amostra pode se tornar capacitada espontaneamente. Essa sub-população, por hipótese, possuiria uma quantidade menor de fatores decapacitantes, ou mesmo, os perderia com maior facilidade.

TABELA 5: Frequências (%) da distribuição por domínios dos compartimentos dos espermatozoides de 26 carneiros da raça Santa Inês após o processo de congelamento/descongelamento avaliados em microscopia epifluorescente por diferentes combinações de sondas fluorescentes: IP (iodeto de propídeo); FITC-PSA (aglutinina *Pisum sativum*) e JC-1 (**J-agregados**), MITO (**Mitotracker Green FM**), R-123 (**Rodamina 123**)

Combinação das sondas	Domínios			
	Membrana plasmática lesada - %	Membrana acrossomal lesada - %	Potencial membrana mitocondrial	Potencial membrana mitocondrial
			baixo - %	sem - %
IP/PSA/JC-1	49,1	26,7	97,9	--
IP/PSA/MITO	64,8	24,4	--	45,5
IP/PSA/R-123	52,0	51,5	--	63,4

Valcárcel et al., (1997) demonstraram que, pelo menos 30% dos espermatozoides ovinos, que apresentam motilidade após os processos de criopreservação, possuem suas membranas lesionadas. Desta forma, eles rapidamente perdem sua motilidade a 37° C, tornando-se afuncionais *in vivo*. Para Pérez et al., (1996), os espermatozoides ovinos no sêmen congelado demandam menor tempo para a ocorrência da capacitação *in vitro*, evidenciando assim, uma capacitação prematura.

Concomitante à capacitação estão os fenômenos de hiper-ativação e de reação acrossomal. Devido à hiper-ativação ser causada por mudanças no padrão de movimento flagelar, a capacitação provavelmente envolve alterações nas propriedades físicas e químicas da membrana plasmática da cauda e da cabeça dos espermatozoides (MORTIMER, 1997).

Nos espermatozoides de hamster, a hiper-ativação foi associada com a redução da frequência de batimento flagelar e o aumento da curvatura flagelar (MORTIMER, 1997).

Com a evolução na análise da cinética espermática pelo sistema CASA, tornou-se possível evidenciar parâmetros que poderiam indicar a hiper-ativação na maioria das espécies estudadas, sendo eles, altos valores para VCL e de ALH e baixos para LIN ou WOB. Tais propriedades refletem diretamente as características do movimento flagelar, havendo maior amplitude das ondulações flagelares, assim como maior flexibilidade da peça intermediária proximal. A hiper-ativação é um fenômeno flagelar, mesmo freqüentemente sendo avaliada pelos movimentos da cabeça espermática (MORTIMER, 1997, VERSTEGEN et al., 2002, BUFFONE et al., 2004).

Diante do exposto, determinou-se a classificação dos animais pelo emprego do teste MITO, ranqueando o sêmen congelado dos carneiros nas oito categorias. Esse resultado é apresentado na Tabela 6.

Após análise inicial dos dados (TAB. 2, 3 e 4) verificou-se ser importante considerar como resposta à variabilidade apresentada pelos carneiros, respectivamente em cada variável, exceção feita para as variáveis, mitocôndria e motilidade, cuja medida considerada foi a mediana e a média dos valores, para cada animal.

A variabilidade torna-se importante devido a trabalhos que mostram a presença de sub-populações distintas no ejaculado de algumas espécies (ABAIGAR et al., 1999, ABAIGAR et al., 2001, QUINTERO-MORENO et al., 2003, NÚÑEZ-MARTINEZ et al., 2006).

TABELA 6: Categorização geral do sêmen congelado de 26 carneiros da raça Santa Inês determinada pela associação das sondas fluorescentes iodeto de propídeo, aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com o isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e *Mitotracker Green FM* (CELEGHINI, 2005 adaptada)

Categoria	Número do carneiro
1.	-
2.	14, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26
3.	-
4.	-
5.	1, 2, 6, 9, 11, 12, 15, 17
6.	7, 10, 13, 22
7.	3, 4, 5, 8
8.	16

1. Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com potencial de membrana mitocondrial; 2. Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e sem potencial de membrana mitocondrial; 3. Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e com potencial de membrana mitocondrial; 4. Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e sem potencial de membrana mitocondrial; 5. Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com potencial de membrana mitocondrial; 6. Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e sem potencial de membrana mitocondrial; 7. Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com potencial de membrana mitocondrial; 8. Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial de membrana mitocondrial

Abaigar et al., (2001) encontraram quatro sub-populações ao analisarem o sêmen refrigerado de gazelas. Nesse estudo, a sub-população 3 representou mais de 50% da amostra e foi determinado que ela representava a população de células com maior movimento progressivo, a qual foi relacionada com os valores de motilidade convencional das amostras.

Núñez-Martínez et al., (2006), trabalhando com sêmen canino *in natura* e congelado, encontraram a presença de 11 e 9 sub-populações, respectivamente.

Com o objetivo de reduzir a dimensionalidade, para facilitar o entendimento dos dados, optou-se por uma técnica exploratória multivariada de dados conhecida como Análise Fatorial.

Após análise preliminar foram consideradas como variáveis importantes para a interpretação dos fatores as variáveis: VAP; VSL; VCL; ALH; BCF; STR;

LIN; ELONG; MITO; MT. Seguindo os critérios das raízes latentes maiores que 1 (F1: 4,6; F2: 2,50 e F3: 1,38) e também a percentagem da variabilidade total dos dados explicada pelos fatores, optou-se por utilizar como dimensionalidade final aquela dada por três fatores com 79% de explicação da variabilidade total (TAB. 7).

Apesar de não se considerar a população total dos espermatozóides com objetivo de agrupá-los sem a informação da sua procedência, verificou-se a existência de três agrupamentos quanto às características analisadas (F1, F2 e F3).

Ao analisar a literatura, verificou-se a mesma preocupação por parte de vários autores, os quais consideravam essa grande quantidade de parâmetros analisados muitas vezes confusos para uma real interpretação dos dados, visto que muitos deles derivam de operações matemáticas onde eles fazem parte efetivamente do resultado.

Para Quintero-Moreno et al., (2003), esse é um problema existente no sistema Casa, onde o grande número de parâmetros fornecidos pelo equipamento, na maioria das vezes, está altamente correlacionado. Isto torna difícil uma avaliação objetiva de quais os parâmetros que poderiam explicar acuradamente o movimento espermático.

Segundo Abaigar et al., (2001), a grande quantidade de dados gerada pelo sistema CASA poderia ser simplificada, tornando-o mais informativo, além do programa do computador ter sido designado para detectar grupos com grandes afinidades de dados, não sendo limitado à sua distribuição na amostra.

Desta maneira, após a padronização dos valores apresentados obteve-se as cargas fatoriais que estão apresentadas na Tabela 7. Pode-se verificar pela Tabela 7 que as cargas do primeiro fator F1 são positivas e têm valores altos para as variáveis VAP, VSL, STR e LIN, que foi interpretado com um fator relacionado à progressividade do movimento. Para o segundo fator F2, as cargas com sinal negativo, associam as variáveis VCL, ALH e MT, que representam um fator de deslocamento espermático sem considerar a direção do movimento. Para o terceiro fator F3, estão associadas as variáveis BCF, MITO e ELONG, cuja interpretação diz respeito à energia disponível/ disponibilizada para a movimentação espermática.

TABELA 7: Cargas fatoriais e comunalidade, por variável, para fatores não rotacionados e fatores rotacionados pelo método VARIMAX e, variação percentual explicada através de cada fator e total

Variável	Fatorial não rotacionada			Fatorial rotacionada			Comunalidade
	F1	F2	F3	F1 rot	F2 rot	F3 rot	
VAP	0,98	0,11	-0,11	0,89	-0,40	0,19	98 %
VSL	0,98	0,14	-0,04	0,88	-0,37	0,25	98 %
VCL	0,64	-0,59	-0,29	0,30	-0,85	-0,12	84 %
ALH	0,12	-0,77	-0,27	-0,22	-0,75	-0,27	69 %
BCF	-0,33	0,17	-0,76	0,03	0,24	-0,82	73 %
STR	0,27	0,52	-0,46	0,90	0,09	-0,22	88 %
LIN	0,64	0,62	0,01	0,83	0,21	0,24	79 %
ELONG	-0,35	-0,43	-0,57	-0,34	-0,25	-0,67	62 %
MITO	-0,38	0,65	-0,29	0,10	0,72	-0,34	64 %
MT	0,73	-0,48	0,10	0,32	-0,77	0,28	78 %
Variância Explicada	34 %	29 %	16 %				79 %

VAP - Velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme desprezando-se o deslocamento lateral da célula espermática; VSL - Velocidade retilínea considerando-se a trajetória espermática uma reta; VCL - Velocidade de deslocamento real dos espermatozoides; ALH - Deslocamento lateral de cabeça; BCF - Frequência de batimento; LIN - Linearidade; STR - Índice retilíneo do movimento espermático; MT - Motilidade total

As definições do papel dos fatores F1, F2 e F3, além da observação direta da aplicabilidade desses parâmetros na avaliação tradicional da cinética espermática, baseou-se nas descrições da literatura. Núñez-Martínez et al., (2006) procederam análise similar a desse experimento no sêmen congelado de cães, empregando fatores rotacionados pelo método VARIMAX, obtendo um padrão bi-dimensional, sendo o fator 1 relacionado às velocidades VCL, VAP, VSL e ao parâmetro ALH, enquanto o fator 2, às características específicas do movimento espermático tais como, LIN, STR e WOB. Com essa metodologia, esses autores resumiram as variáveis inicialmente obtidas, de sete para dois componentes principais.

Assim como as mitocôndrias existentes na peça intermediária, que fornecem energia para o movimento flagelar, Mortimer (1997) descreveu que o parâmetro BCF foi desenvolvido para dar uma indicação da frequência de batimento flagelar, baseado nos fatos de que cada ponto da trajetória seria resultado da mudança no batimento, e cada momento em que o caminho curvilíneo cruza o caminho médio, o resultado de um novo batimento flagelar.

A partir desse dado foi realizada a determinação dos escores dos coeficientes dos fatores considerando as variáveis (TAB. 8), permitindo determinar a seguir essa relação para cada carneiro, agrupado-os (TAB. 9).

Na literatura, vários pesquisadores aplicaram metodologia similar, como por exemplo, Quintero-Moreno et al., (2003), que agruparam os parâmetros oferecidos pelo sistema CASA em cinco grupos, sendo que os parâmetros com maior coeficiente de determinação (r^2) dentro dos grupos foram os selecionados para a análise e determinação das sub-populações espermáticas. Os agrupamentos

foram variáveis em função da espécie estudada, condição a que a amostra foi submetida (sêmen *in natura*, refrigerado ou congelado).

TABELA 8: Escore dos coeficientes dos fatores considerando-se os parâmetros de cinética espermática fornecidos pelo sistema CASA para o sêmen congelado de 26 carneiros da raça Santa Inês, tendo como base a variabilidade existente na amostra

Variável	Fatores		
	F1	F2	F3
VAP	0,24	-0,09	-0,001
VSL	0,23	-0,08	0,04
VCL	0,07	-0,30	-0,17
ALH	-0,08	-0,30	-0,19
BCF	0,12	0,05	-0,55
STR	0,32	0,07	-0,26
LIN	0,25	0,13	0,07
ELONG	-0,04	-0,14	-0,43
MITO	0,11	0,25	-0,21
MT	0,03	-0,25	0,11

VAP - Velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme desprezando-se o deslocamento lateral da célula espermática; VSL - Velocidade retilínea considerando-se a trajetória espermática uma reta; VCL - Velocidade de deslocamento real dos espermatozoides; ALH - Deslocamento lateral de cabeça; BCF - Frequência de batimento; LIN - Linearidade; STR - Índice retilíneo do movimento espermático; MT - Motilidade total

Após a redução de dimensionalidade dez para dimensionalidade três, a distribuição dos indivíduos pode ser visualizada através da aplicação de análise de agrupamento, dendograma, conforme a Figura 1.

TABELA 9: Escore dos fatores rotacionados (rot) para 26 amostras de sêmen congelado carneiros da raça Santa Inês com base na variabilidade

Carneiro	Escore		
	F1rot	F2 rot	F3 rot
01	-0,35	-0,30	-2,26
02	-2,21	-2,34	0,31
03	0,22	1,52	0,36
04	-1,15	1,63	0,31
05	0,49	1,14	-0,27
06	-0,81	-0,09	-0,36
07	-0,45	-0,43	-0,44
08	-0,73	0,43	-1,94
09	-0,50	0,19	-0,27
10	1,01	0,74	-0,21
11	0,59	-0,55	-0,75
12	0,92	0,90	0,42
13	-2,83	-1,24	1,38
14	-0,68	-0,43	0,81
15	0,42	0,11	-0,50
16	-0,64	0,56	-0,87
17	0,91	-0,08	1,11
18	0,84	-0,98	1,15
19	0,79	-0,44	-0,65
20	-0,01	-1,03	0,39
21	1,01	0,10	-0,57
22	0,65	1,60	0,57
23	0,50	-1,10	2,12
24	0,87	0,03	1,33
25	0,85	-0,95	-0,89
26	0,31	-1,45	-0,27
Raiz latente	4,06	2,50	1,38

Quintero-Moreno et al., (2003) encontraram para o sêmen eqüino *in natura* e refrigerado, a presença de quatro sub-populações distintas, sendo que, após o processo de refrigeração, evidenciou-se um deslocamento das porcentagens de espermatozóides presentes em cada classe.

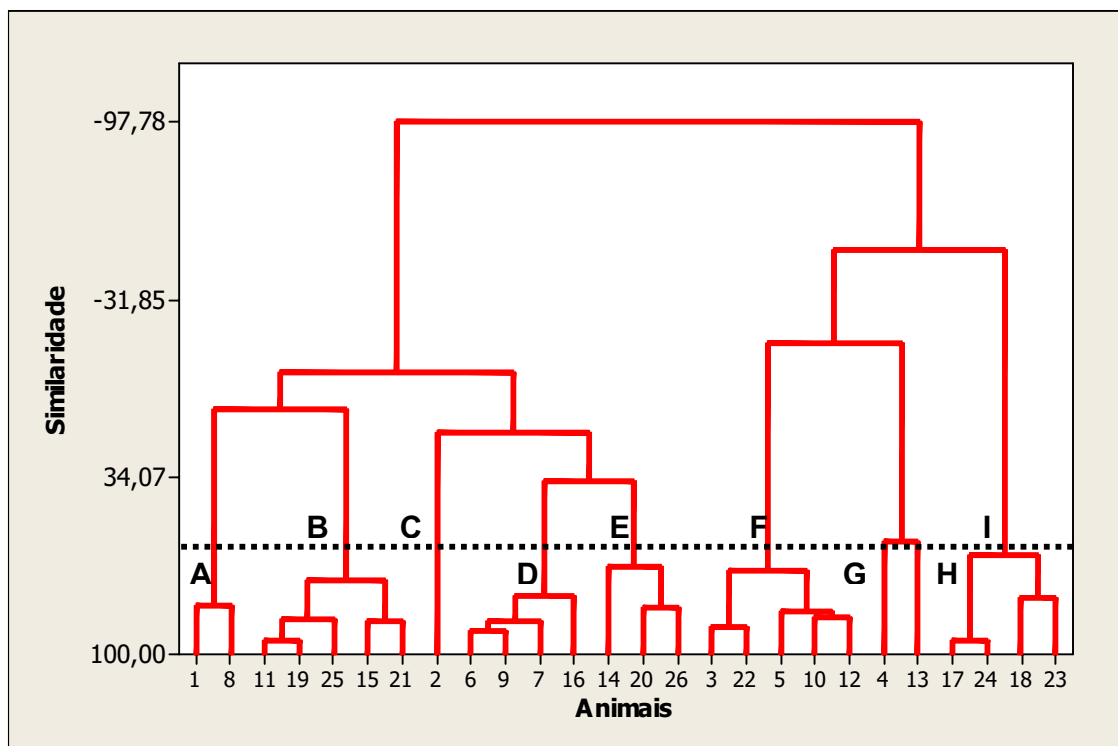


FIGURA 1: Dendrograma, representação gráfica do processo de agrupamento hierárquico de 26 amostras de sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês, baseado na variabilidade, com valor de similaridade máxima igual a 100,00.

Ao analisarem o sêmen refrigerado de cachaaos, Quintero-Moreno et al., (2004) encontraram três sub-populações. Martinez-Pastor et al., (2005) obtiveram a formação de quatro agrupamentos de reprodutores considerando a congelabilidade da amostra, com 3 sub-populações.

Esses autores relataram que na literatura consultada, independente da forma de análise para agrupamento (*clustering*), da espécie ou da fonte dos espermatozóides (ejaculado ou epidídimo), três ou quatro sub-populações na média, foram detectadas.

Segundo Martinez-Pastor et al., (2005), um efeito fundamental do método de agrupamento é a seleção do número final de grupos obtidos para a análise. O estudo da distância dos agrupamentos e dos dendogramas produzidos pelo agrupamento hierárquico pode, significativamente, ajudar, especialmente quando tem se conhecimento prévio da estrutura interna dos dados analisados.

Para explicar os agrupamentos, lançou-se mão do recurso de disposição tridimensional das amostras de sêmen congelado dos carneiros apresentado na Figura 2.

O sêmen congelado dos carneiros 2, 4 e 13 é muito diferente do restante dos animais. Desta maneira, abaixo do nível de similaridade dos animais 4 e 13 traçou-se uma linha horizontal de corte, obtendo-se assim a formação de 9 grupos distintos, denominados A, B, C, D, E, F, G, H, e I.

Abaigar et al., (1999 e 2001) empregaram um processo semelhante para a formação dos agrupamentos das sub-populações espermáticas.

As amostras provenientes dos animais 2, 4 e 13 formam grupos unitários. Para a amostra do animal número 2 (grupo C), foram encontrados valores baixos nos três fatores. No material dos animais 4 (grupo G) e 13 (grupo H) encontrou-se valores baixos em progressividade do movimento e disponibilidade de energia, porém com bom deslocamento.

As amostras de sêmen congelado dos animais 2, 4 e 13 foram consideradas como *outliers*, fato freqüentemente verificado na literatura (GARNER et al., 1997).

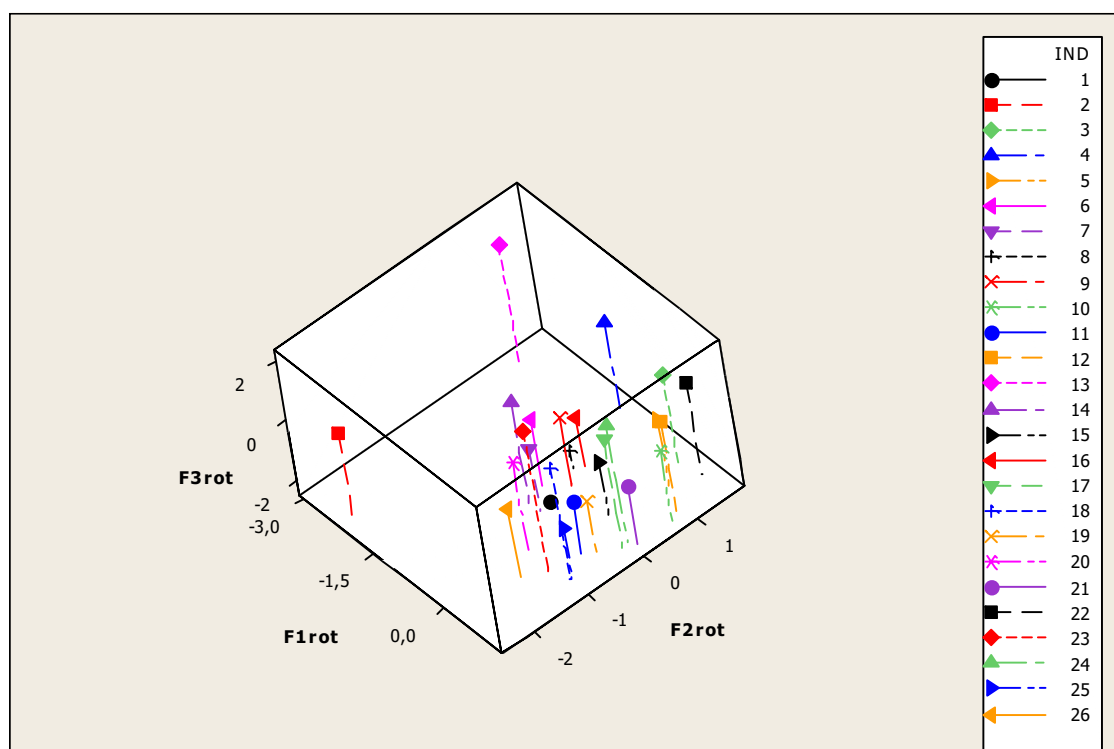


FIGURA 2: Gráfico representativo de 26 amostras de sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês, baseado na variabilidade, dado pelos escores fatoriais rotacionados F1 rot (variáveis VAP, VSL, STR e LIN), F2 rot (variáveis VCL, ALH e MT) e F3 rot (variáveis BCF, MITO e ELONG).

IND – número do animal

Apesar de não empregarem o agrupamento de parâmetros, trabalhando apenas com a análise da motilidade convencional e a com a combinação das sondas JC-1, MITO e R-123, Garner et al., (1997) avaliando sêmen congelado de touros também detectaram animais *outliers*. Eles atribuíram esse fato à dificuldade de acessar a motilidade nas amostras com baixa qualidade.

Núñez-Martínez et al., (2006) aplicaram o agrupamento de parâmetros de forma similar a esse experimento e detectaram *outliers*, os quais, devido à sua influência no processo de agrupamento, foram excluídos da análise.

Para os carneiros 1 e 8 (grupo A), encontrou-se os melhores valores de energia, porém fraco em progressividade e mediano em deslocamento.

No grupo constituído pelos animais 11, 19, 25, 15 e 21 (grupo B), bons valores de progressividade e valores de mediano para baixo em deslocamento e disponibilidade de energia foram verificados.

Para o grupo formado pelos carneiros 6, 9, 7 e 16 (grupo D) verificam-se baixos valores em energia disponível e progressividade e valores medianos em deslocamento espermático.

O grupo dos animais 14, 20 e 26 (grupo E) apresentou-se com baixos valores de energia disponível e deslocamento, sendo o carneiro 14 fraco em direção, e os demais animais com valores medianos para progressividade.

O grupo dos animais 3, 22, 5, 10 e 12 (grupo F) com altos valores de progressividade e deslocamento, porém apresentaram valores ruins em disponibilidade de energia.

Em seu estudo com sêmen de cães, Núñez-Martínez et al., (2006) levantaram a hipótese de que os agrupamentos possuidores dos maiores valores de velocidade e com movimento mais progressivo seriam considerados com maior potencial para a fertilização.

O grupo dos animais 17, 24, 18 e 23 (grupo I) apresenta em seu material, alto valor para progressividade, de mediano para baixo em deslocamento e fraco em energia disponível.

Abaigar et al., (1999) obtiveram três agrupamentos dos espermatozóides *in natura* de cachacos sendo que no grupo 1 foram verificados espermatozóides com alto movimento progressivo (alto VSL) e vigorosa ação flagelar (alto BCF). No grupo 2, observaram espermatozóides com movimento ativo (alto VCL) mas com redução significativa da progressão (baixo VSL e alto ALH). No grupo 3 houve, provavelmente, células lentas e degeneradas devido a todos os parâmetros dos grupos 1 e 2 estarem baixos.

Quintero-Moreno et al., (2004), também estudaram o sêmen refrigerado de cachacos e verificaram três sub-populações sendo observado na sub-população 1, os espermatozóides mais rápidos, com baixa linearidade. Na segunda sub-população, foram agrupados 90% dos espermatozóides, sendo estes caracterizados por baixa velocidade, alta progressividade, movimento pouco ondulante, sendo o valor de BCF similar às demais sub-populações. A sub-população 3, não apresentou movimento linear (alto ALH), contudo as células possuíam alto valor de VAP, indicando espermatozóides muito ativos. Contudo, ao analisarem a estrutura das sub-populações de cada reprodutor, não verificaram grandes variações entre os animais, sendo apenas o valor de VAP discordante entre eles.

Na análise do sêmen canino, Núñez-Martínez et al., (2006), verificaram 91% da variabilidade acumulada utilizando-se de dois fatores. Esses pesquisadores não incluíram em suas análises parâmetros como BCF ou MITO, responsáveis pela formação do fator F3 neste experimento. Contudo, relataram a importância da inclusão da avaliação das mitocôndrias na análise multivariada,

visto que se caracterizavam como estruturas sensíveis ao processo de criopreservação.

A análise no plano bidimensional permite uma avaliação direta do comportamento das células, visto que há possibilidade de cortes desse plano, produzindo quadrantes, conforme demonstrado na figura 3. Contudo, dependendo das variáveis/parâmetros inicialmente empregadas e dos fatores gerados, poderá haver a redução da variabilidade acumulada, como ocorreu neste experimento (79% vs 63%).

A Figura 3 apresenta, no plano bidimensional, a disposição dos animais, segundo os fatores F1 e F2, que, conjuntamente, explicam 63% da variabilidade total.

Martinez-Pastor et al., (2005) procederam comparação similar entre os dados de agrupamento de reprodutores fornecidos pelo dendograma frente à avaliação bidimensional utilizando os dois principais fatores. Contudo, esses autores obtiveram quatro agrupamentos de reprodutores, possibilitando a representação, através de elipses, do dendograma no plano bidimensional. Tal situação não será possível neste gráfico, visto a sobreposição das linhas de agrupamento.

De forma similar a esse experimento, Núñez-Martínez et al., (2006), empregando o plano bimodal, verificaram a possibilidade do agrupamento dos cães mediante os resultados da análise multivariada, concluindo que o grupo de cães que apresentavam as maiores velocidades antes da congelação, apresentaram melhores resultados após o processo de criopreservação. Essa constatação pode abrir possibilidades práticas no estudo da conservação do

sêmen nas diferentes espécies. Esses pesquisadores também evoluíram a idéia no sêmen canino, determinando índices para a velocidade e o movimento espermático por meio de equações matemáticas.

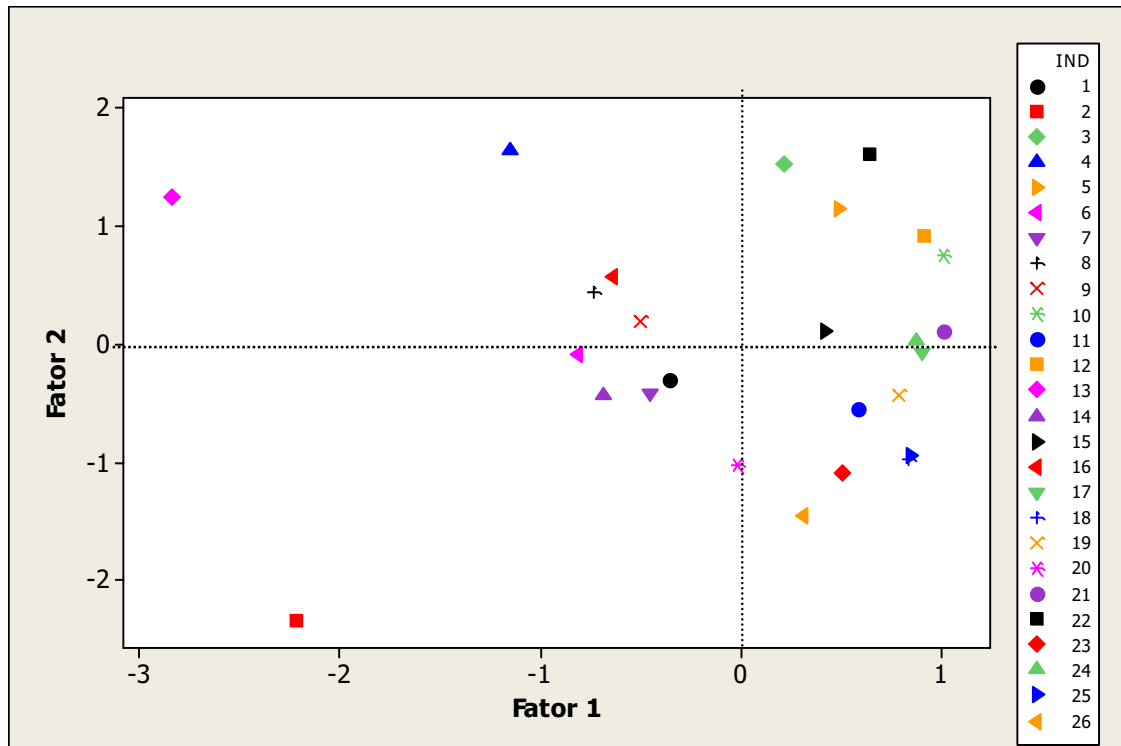


FIGURA 3: Disposição de 26 amostras de sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês, baseada na variabilidade, no plano bidimensional considerando os fatores rotacionados F1 (variáveis VAP, VSL, STR e LIN) e F2 (variáveis VCL, ALH e MT).

IND – número do animal

Reitera-se que, apesar de muitos trabalhos terem sido publicados com o sistema CASA, os resultados poderiam ser mais esclarecedores, visto que, em muitos casos há apenas a comparação de médias.

Apesar de não ser ainda muito empregado, o método de análise multivariada das sub-populações espermáticas, segundo revisão feita por

Martinez-Pastor et al., (2005), evidenciou aspectos interessantes dos experimentos, situação não constatada com a análise estatística “clássica” baseada em médias.

Outro aspecto a ser considerado é que, muitas vezes, não se possui idéia do real valor numérico dos parâmetros analisados, assim como seu papel nos aspectos de fertilidade da amostra. De forma geral, há a adoção da idéia: quanto maior o valor do parâmetro em questão, melhor a amostra. Contudo, torna-se claro que muitos parâmetros devem permanecer dentro de limites fisiológicos para sua condição de manipulação, tornando assim, a célula espermática viável para desempenhar seu papel durante o processo da fertilização.

Avaliações clássicas dos dados do sistema CASA mostram que a distribuição normal raramente é encontrada. Distribuições bimodais e distorcidas geralmente ocorrem em conjunto com marcantes amplitudes de variação, as quais refletem a presença de sub-populações distintas dentro da amostra. Tais amplitudes tendem a mascarar os efeitos de tratamento se os parâmetros analisados forem avaliados individualmente, devido aos desvios padrão serem muito altos para permitir sua detecção pelos testes estatísticos. Esse problema é causado parcialmente pela existência de sub-populações, onde mesmo que algumas possam ser afetadas pelo tratamento, outras não respondem, podendo confundir as tentativas de análise por interferirem nas médias.

Quintero-Moreno et al., (2004), não verificaram correlação significativa na taxa de concepção ou de prolificidade com a qualidade do sêmen refrigerado em suínos, quando analisaram as médias dos resultados.

Núñez-Martínez et al., (2006) relataram esse problema ao realizarem, de forma comparativa, a análise estatística clássica e a multivariada no sêmen *in natura* e congelado de cães. Não houve efeito significativo da criopreservação sobre a porcentagem total de células móveis na avaliação tradicional, enquanto que foram evidenciadas mudanças significativas nas características da cinética espermática (redução da porcentagem de células com motilidade progressiva, das velocidades, havendo, particularmente, a redução significativa no agrupamento de células com alta velocidade).

Uma solução para esse problema é avaliar a estrutura das sub-populações presentes na amostra antes de tecer hipóteses, usando a natureza multivariada do CASA para ajudar a reconhecer os diferentes tipos de células dentro da amostra global (ABAIGAR et al., 1999).

Talvez o conceito de bons e maus congeladores como postulado, estenda-se das variações do sêmen de diferentes indivíduos até à habilidade individual dos espermatozóides dentro da mesma amostra em sobreviver à criopreservação.

Este é um aspecto importante, pois muitos centros poderão realizar avaliações prévias das sub-populações de espermatozóides durante os procedimentos do exame andrológico, predizendo as amostras que apresentarão os melhores resultados pós-congelação (CONNELL et al., 2002).

Atualmente, a presença de várias sub-populações dentro da amostra global dos espermatozóides é amplamente aceita pela comunidade científica. Entretanto, o mecanismo da formação dessas sub-populações e seu papel fisiológico ainda não estão claros. Para muitos pesquisadores, a compreensão da susceptibilidade à capacitação e a habilidade de realizar a fertilização, dependerão do estudo das

sub-populações de espermatozóides (QUINTERO-MORENO et al., 2004; MARTINEZ-PASTOR et al., 2005).

Para Quintero-Moreno et al., (2003), tal idéia já foi comprovada, pois estudando espermatozóides de garanhões, encontraram que ejaculados com alta fertilidade tinham em comum uma parcela especial da sub-população.

Da análise dos dados e da confrontação com a literatura consultada, é possível uma nova perspectiva de avaliação da cinética espermática, visto que a detecção e a compreensão das sub-populações poderá fornecer importantes resultados para a monitorização dos espermatozóides, principalmente quando associada a testes de fertilidade.

7. CONCLUSÕES

A análise computadorizada do movimento espermático (CASA) no sêmen congelado de ovinos fornece informações necessárias ao entendimento da cinética das sub-populações, viabilizando que centenas de células sejam avaliadas durante um procedimento de rotina, possibilitando ampliar os horizontes do conhecimento da biotecnologia da criopreservação, incrementando no futuro a taxa de fertilidade com o uso da inseminação artificial com sêmen congelado.

A identificação das diferenças fisiológicas e cinemáticas das sub-populações, associada à combinação de sondas fluorescentes na avaliação da fertilidade do sêmen congelado dos carneiros, poderá auxiliar na discussão de fatores que limitam a habilidade do sêmen congelado atravessar as barreiras que o levariam até o sítio de fertilização.

Os *softwares* presentes nos modelos do sistema CASA facilitam o acompanhamento da cinética das sub-populações do sêmen congelado ovino, pois agrupam em uma só análise, os parâmetros de avaliação da cinética associados ao seu correspondente da integridade das membranas dos espermatozóides, determinado pela combinação das sondas fluorescentes.

Desconsiderar a existência e, principalmente, os efeitos biológicos da presença das sub-populações espermáticas nos resultados médios torna-se temerário devido às imprecisões na obtenção de resposta aos estímulos propostos nos ensaios de criopreservação do sêmen.

Com o uso da análise estatística multivariada do sêmen congelado ovino, foi possível determinar no sistema de análise computadorizada do movimento espermático que o parâmetro da cinética espermática BCF (frequência de batimentos) expressa analogia com as características obtidas na avaliação em microscopia epifluorescente com a combinação das sondas IP; FITC-PSA e MITO, empregadas na determinação da condição das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, respectivamente.

A análise estatística multivariada do sêmen congelado ovino mostra-se mais informativa do que a avaliação clássica, ainda baseada em valores médios e em dados de variância.

Por possibilitar o agrupamento de amostras de sêmen congelado levando em conta diversos parâmetros de cinética e de integridade dos compartimentos celulares pela combinação de sondas fluorescentes das unidades espermáticas de forma individual, a análise multivariada oferece a possibilidade da realização de ensaios com um número menor de indivíduos, o que reduz o custo da execução de alguns projetos.

8. REFERÊNCIAS¹³

ABAIGAR, T; HOLT, W. V.; HARRISON, R. A. P.; DEL BARRIO, G. Sperm subpopulations in boar (*Sus Scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhor*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. **Biol. Reprod.** v. 60, p. 32-41, 1999.

ABAIGAR, T; CANO, M.; PICKARD, A. R.; HOLT, W. V. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhor*): effects of body weight, eletroejaculation technique and short-term semen storage. **Reprod.** v. 122, p. 265-273, 2001.

AMANN, R. P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **J. Androl.**, v. 10, p.89, 1989.

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **J. Androl.**, v. 25, p. 317-325, 2004.

ANZAR, M.; HASSAN, M. M.; GRAHAM, E. F.; DEYO, R. C. M.; SINGH, G. Efficacy of the Hamilton Thorn Motility Analyzer (HTM-2030) for evaluation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 36, p. 307-317, 1991.

AUGER, J.; RONOT, X.; DADOUNE, J. P. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. **J. Androl.** v. 10, p. 439-448, 1989.

AZEVEDO, H. C. **Cinética, morfologia, integridade das membranas plasmática e mitocondrial, capacitação espermática e integridade e reação do acrossomo de espermatozóides ovinos submetidos à criopreservação: efeito da adição de colesterol, desmosterol e ácido oléico-linoléico ao meio**

13 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

diluidor. 2006. 194 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de Estadual Paulista. Botucatu.

BOUNDY, T. Collection and interpretation of ram semen under general practice conditions. **In Pract.**, v. 15, p 219-23, 1993.

BUFFONE, M. G.; DONCEL, G., F.; MARÍN BRIGGILER, C. I.; VAZQUEZ-LEVIN, M. H.; CALAMERA, J. C. Human sperm subpopulations: relationship between functional quality and protein tyrosine phosphorylation. **Hum. Reprod.** v. 19, p. 139-146, 2004.

BUNCH, T. D.; ELLSWORTH, H.S. Gross anatomy of the ovine cervix. **Int. Goat Sheep Res.**, v.4, p. 282-285, 1981.

CARVALHO, F. P.; QUIRINO, C. R.; CARVALHO, C. S. P.; UENO, V. G.; LEAL, A. C. M.; SILVA, J. F. S. Características seminais de ovinos da Raça Santa Inês na Região do Norte do Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 26, p. 67-69, 2002.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura de cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes.** 2005. 186 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CONNELL, M. O.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Hum. Reprod.** v. 17, p. 704-709, 2002.

COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G., FRANCESCHI, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the γ -aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,2',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 197, p. 40-45, 1993.

-
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Sydney; Butterworths, 1987. p.194.
- FARRELL, P.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R. H.; DOUGLAS-HAMILTON, D. Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. **Fertil. Steril.**, v. 64, p. 208-210, 1995.
- FERREIRA, J.C.P. **Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelção do sêmen eqüino**. 2000. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu.
- FONSECA, V. O.; VALE FILHO, V. R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J. J. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA, p. 30-31, 1992.
- GARNER, D. L. Ancillary tests of bull semen quality. **Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.**, v. 13, n. 2, p. 313-327, 1997.
- GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol. Reprod.** v. 57, p. 1401-1406, 1997.
- GHALSASI, P. M.; NIMBKAR, C. Evaluation of laparoscopic intrauterine insemination in ewes. **Small Ruminant Res.**, v. 23, p. 69-673, 1996.
- GONZALEZ, C. I. M.; OBA, E.; BICUDO, S. D.; SOUZA, M. I. L. Cryopreservation of semen in Ideal rams with glycine-egg yolk-extender. In: International Congress of Animal Reproduction, 13; 1996, Sydney. **Proceedings...**Sidney, 1996. p. 2-9.
- GUERIN, Y. **Methodes de conservation de la semence ovine**. Nouzilly: Station de Physiologie de la Reproduction, 1990. p. 236-314.

-
- HAIR Jr., J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C. **Análise multivariada de dados**. 5 ed. São Paulo: Bookman Companhia Editora - Artmed Editora S. A ., 2005.
- HENRY, M., NEVES, J. P. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen Animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - Cbra, 1996. p.40-5.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 3-22, 2000.
- HOLT, W. V.; PALOMO, M. J. Optimization of a continuous real-time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 8, p. 219-230, 1996.
- JASKO, D. J.; LITTLE, T. V.; SMITH, K.; LEIN, D. H.; FOOTE, R. H. Objective analysis of stallion sperm motility. **Theriogenology**, v. 30, p. 1159-1167, 1988.
- JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. 3. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1992.
- KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; ALEXOPOULOS, C.; AMARANTIS, I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. **Small Ruminant Res.**, v. 37, p. 125-130, 2000.
- KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; KARATZAS, G.; BROZOS, C. Effect of time of artificial insemination on fertility of progestagen and PMSG treated indigenous Greek ewes, during non-breeding season. **Small Ruminant Res.**, v. 39, p. 67-71, 2001.
- LÓPEZ, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. **Acta Vet. Scand.**, v. 40, p. 1-9, 1999.

-
- MAGISTRINI, M.; GUITTON, E.; LEVERN, Y.; NICOLLE, J. CL.; VIDAMENT, M., KERBOEUF, D.; PALMER, E. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 48, p. 1229-1235, 1997.
- MAIA, M. S. **Viabilidade do sêmen ovino criopreservado em diluidores adicionados de surfactante e antioxidante**. 2006. 147 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu.
- MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen a review. **Theriogenology**, v. 48, p. 523-530, 1997.
- MARCHETTI, C.; JOUY, N.; LEROY-MARTIN, B.; DEFOSSEZ, A.; FORMSTECHE, P.; MARCHETTI, P. Comparison of four fluorochromes for the detection of inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. **Hum. Reprod.** v. 19, p. 2267-2276, 2004.
- MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; HERRAEZ, P.; ANEL, L, PAZ, P. Sperm subpopulation in Iberian Red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. **Biol. Reprod.** v. 72, p. 316-327, 2005.
- MATHUR, S.; CARLTON, M.; ZIEGLER, J. A. Computerized sperm motion analysis. **Fertil. Steril.**, v. 46, 484-488, 1986.
- MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 42, p. 55-65, 1996.
- MESEGUER, M.; GARRIDO, N.; MARTÍNEZ-CONEJERO, J. A.; SIMÓN, C.; PELLICER, A.; REMOHÍ, J. Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing. **Fertil. Steril.** v. 81, p. 588-594, 2004a.

-
- MESEGUER, M.; GARRIDO, N.; MARTÍNEZ-CONEJERO, J. A.; 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. Assisted Reprod. Genetics.** v. 21, p. 445-551, 2004b.
- MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial.** 6^a ed., Porto Alegre: Sulina, 1987, v.2.
- MOORE, D. S. **Estatística Básica e Sua Prática.** 3 ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A ., 2005.
- MORAES, L.C.F.; PIEGAS, M.S.; SILVA, J.F.; MARTINS, S.C.R. Considerações sobre o exame andrológico em carneiros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.5, p.9-15, 1981.
- MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Hum. Reprod. Update.** v. 3, p. 403-439, 1997.
- MORTIMER, S. T.; MAXWELL, W. C. Kinematics definition of ram sperm hyperactivation. **Reprod. Fertil. Dev.** v. 11, p. 25-30, 1999.
- MORTIMER, S. T.; MAXWELL, W. C. Effect of medium on kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reprod.** v. 127, p. 285-291, 2004.
- MOSES, D. F.; DE LAS HERAS, M. A.; VALCÁRCEL, A.; PÉREZ, L., BALDASSARRE, H. Use of computerized motility analyser for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. **Andrologia**, v. 27, p. 25-29, 1994.
- NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; BAG, S.; PAREEK, S. R.; MITTAL, J. P. Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. Technical note. **Small Ruminant Res.**, v. 29, p. 329-333, 1998.

-
- NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; DAS, G. K.; MITTAL, J. P. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. **Small Ruminant Res.**, v. 39, p. 199-208, 2001.
- NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGÜERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 51, p. 721-727, 1999.
- NUÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORAN, J. M.; PEÑA, F. J. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. **Reprod. Dom. Anim.** v. 41, p. 408-415, 2006.
- OEHNINGER, S.; DURU, N. K.; SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 169, p. 3-10, 2000.
- OLLERO, M.; PEREZ-PE, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J. A. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. **Cryobiology**, v. 37, p. 1-12, 1998.
- PAGANINI FILHO, P. **Estudo da viabilidade do sêmen ovino frente a três diluentes em temperatura de 37° C e sob refrigeração.** 1999. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu.
- PAPAIIOANNOU, K. Z.; MURPHY, R. P.; MONKS, R. S.; HYNES, N.; RYAN, M. P.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 48, p. 299-312, 1997.
- PÉREZ, L. J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; MOSES, D.; BALDASSARRE, H. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v. 46, p. 131-140, 1996.

-
- PÉREZ, L. J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; MOSES, D.; BALDASSARRE, H. Storage of pure ram semen at room temperature results in capacitation of a subpopulation of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 47, p. 549-558, 1997.
- PÉREZ-LLANO, B.; YENES-GARCÍA, P.; GARCÍA-CASADO, P. Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37° C. **Theriogenology**, v. 60, p. 1401-1407, 2003.
- PERKINS, N. R.; HILL, J. R.; PEDRANA, R. G. Laparoscopic insemination of frozen-thawed semen into one or both uterine without regard to ovulation site in synchronized merino ewes. **Theriogenology**, v. 46, p. 541-545, 1996.
- QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; TERESA RIGAU, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology**, v. 59, p. 1973-1990, 2003.
- QUINTERO-MORENO, A.; TERESA RIGAU, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. **Theriogenology**, v. 61, p. 673-690, 2004.
- RIJSSELAERE, T.; SOOM, A. V.; MAES, D.; KRUIF, A. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. **Theriogenology**, v. 60, p. 1553-1568, 2003.
- RODELLO, L. **Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelamento de sêmen ovino**. 86 f. 2006. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu,
- RUIZ-PESINI, E.; LAPEÑA, A. C.; DÍES, C.; ÁLVAREZ, E.; ENRÍQUEZ, J. A.; LÓPEZ-PÉREZ, M. J. Seminal quality correlates with mitochondrial functionality. **Clin. Chim. Acta**. v. 300, p. 97-105, 2000.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62. p. 77-111, 2000.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.

SOFTWARE ESTATÍSTICO utilizado: MINITAB, versão 14.

SOUSA, D. B.; BICUDO, S. D.; PAPA, F.O.; FERREIRA, J.C.P. Comparative study of two methods of collect the ram semen (artificial vagina and eletroejaculation) being used conventional and computerized analyses (HTMA-IVOS 10). In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 26; 1999, Lyon, **Proceedings...** Lyon, 1999.

SOUSA, D., B. **Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial.** 103 f. 2002. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

TARDIF, A. L.; FARRELL, P. B.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R. H. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5° C. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 1606-1612, 1997.

TULI, R, K.; SCHMIDT-BAULAIN, R.; HOLTZ, W. Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of bull, boar and goat. **Theriogenology**, v. 38, p. 487-490, 1992.

VALCÁRCEL, A.; de las HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Assessment of acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 45, p. 299-309, 1997.

-
- VANTMAN, D.; BANKS, S. M.; KOUKOULIS, G. Assessment of sperm motion characteristics from fertile and infertile men using a fully automated computer-assisted semen analyser. **Fertil. Steril.**, v. 51, p. 156-161, 1989.
- VARNER, D. D.; VAUGHAN, S. D.; JOHNSON, L. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. **Am. J. Vet. Res.**, v. 52, p. 224-230, 1991.
- VERSTEGEN, J; IGUER-OUADA, M; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.
- VULCANO, G. J.; MOSES, D. F.; VALCÁRCEL, A.; LAS HERAS, M. A. A lineal equation for the classification of progressive and hyperactive spermatozoa. **Math. Biosci.** v. 149, p. 77-93, 1998.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-1, p. 481-492, 2000.
- WINDSOR, D. P. Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination of Merino ewes. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 47, p. 21-29, 1997.
- YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 349-355, 2000.

9. ANEXO I

9.1. Meio diluente Glicina Gema Leite (GONZALEZ et al., 1996) para congelação do sêmen ovino

Solução A

Glicina – Botica ao veado d'ouro (lote 01 F 097)	1,40 g
Citrato de Sódio - Merck KGaA (artigo 1064481000)	2,97 g
Água deionizada e destilada	100 mL

Solução B

Frutose	3,00 g
Água deionizada e destilada	100 mL

Solução Mãe

Solução A	100 mL
Solução B	100 mL
Penicilina G-sódica ou potássica	0,033 g
Dihidroestreptomicina	0,1 g

Meio de Congelação

Meio I	Quantidade (mL)	Meio II	Quantidade (mL)
Solução Mãe	60,0	Solução Mãe	54,6
Gema de ovo	20,0	Gema de ovo	20,0
O E P Procter; Gamble	0,4	O E P Procter; Gamble	0,4
Leite desnatado 11%	15,0	Leite desnatado 11%	15,0
Água deionizada e destilada	4,6	Glicerol	10,0

9.2. Diluição e preparo das sondas soluções fluorescentes (CELEGHINI, 2005) para avaliação das membranas espermáticas

9.2.1. Iodeto de Propídio - IP

Solução Estoque de IP: 25 mg/mL

IP - Sigma-Aldrich 28,707-5, frasco com 25 mg 25,0 mg

DMSO - Sigma-D2650, caixa com 5 frascos de 5 mL 1,0 mL

Solução de Trabalho de IP: 0,5 mg/mL

▪ Solução Estoque de IP 20,0 µL

▪ PBS 980,0 µL

Solução de Trabalho de IP: 2,0 mg/mL

▪ Solução Estoque de IP 80,0 µL

▪ PBS 980,0 µL

Obs: - Aliquotar as soluções e mantê-las congeladas e protegidas da luz.

9.2.2. FITC-PSA**Solução Estoque de Azida de Sódio: 1%**

Azida de Sódio - Sigma-S8032, frasco com 25 g	0,2 g
PBS	20,0 mL

Solução de Trabalho de FITC-PSA: 100 µg/mL

Solução Estoque de Azida de Sódio	10,0 µL
FITC-PSA - Sigma L-0770, frasco com 2 mg	2,0 mg

Obs: - *aliquotar e manter resfriado a 4°C e protegidas da luz.*

9.2.3. Rodamina 123 (R-123, Molecular Probes, R-302 – 25 mg)

Solução estoque (DMSO)	5 mg/mL
Solução de trabalho (DMSO)	0,2 mg/mL (0,53 mM)

Aliquotar as soluções e mantê-las congeladas e protegidas da luz.

9.2.4. Mitotracker Green FM (MITO, Molecular Probes, M-7514, 20 x 50 µg)

Solução de trabalho (DMSO)	1,0 mM
----------------------------	--------

Aliquotar as soluções e mantê-las congeladas e protegidas da luz.

9.2.5. JC-1

Solução Estoque de JC-1: 5 mg/mL

JC-1 - Molecular Probes, T-3168, frasco com 5 mg	5,0 mg
DMSO	1,0 mL

Solução de Trabalho de JC1: 153 μ M

Solução Estoque de JC-1	10,0 μ L
DMSO	490,0 μ L

Obs: - *aliquotar as soluções e mantê-las congeladas e protegidas da luz.*

9.2.6. Solução de X-Cell^{®14}

▪ Glucose Anidra	76,6 g
▪ Citrato de Sódio Bi-hidratado	14,3 g
▪ Bicarbonato de Sódio	2,6 g
▪ EDTA	8,6 g
▪ Cloreto de Potássio	2,5 g
▪ Sulfato de Gentamicina	0,4 g

SOLUÇÃO DE X-CELL

▪ X-Cell	43,4 g
▪ Água Mili Q (qsp)	1000,0 mL

pH e Osmolaridade: 6,89 e 274 mOsm/Kg respectivamente; Armazenar a 5°C.

¹⁴ IMV Technologies (IMV), França

9.3. CASA - Hamilton IVOS 12.3 - Setup¹⁵ 12.3

ANALYSES SETUP	
Frame Rate	60 Hz
Frames Acquired	30
Minimum Contrast	56
Minimum Cell Size	5
Threshold Straightness	80.0
Medium VAP Cut-Off	80.0
Low VAP Cut-Off	20.0
Low VSL Cut-Off	0.0
Nom-Motile Head Size	2
Nom-Motile Head Intensity	50

MINIMUM		MAXIMUM
0.43	Static Size Limits	10.0
0.64	Static Size Limits	1.35
10	Static Elongation Limits	80

CALIBRATION	
Magnification	1.95

VIDEO SOURCE	
Frequency	60 Hz
Field	DARK

ILUMINATION	
Intensity	2400
Photometer: Low	73
High	125

¹⁵ Technical Guide, Hamilton Thorne Biosciences, chapter 2: Starting Parameters for Various Species - Ram, 2005.