



ANA PAULA CASTRO SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES
ESPERMÁTICAS POR PARÂMETROS
MORFOMÉTRICOS E FERTILIDADE EM
SÊMEN BOVINO *Bos taurus indicus***

LAVRAS – MG

2016

ANA PAULA CASTRO SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS POR
PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS E FERTILIDADE EM SÊMEN
BOVINO *Bos taurus indicus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales

Orientador

Prof. Dr. João Bosco Barreto Filho

Coorientador

LAVRAS – MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Santos, Ana Paula Castro.

Identificação de subpopulações espermáticas por parâmetros
morfométricos e fertilidade em sêmen bovino *Bos taurus indicus* /
Ana Paula Castro Santos. – Lavras : UFLA, 2016.

67 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador: José Nélio de Sousa Sales.

Bibliografia.

1. Nelore. 2. Bovine. 3. FIV. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

ANA PAULA CASTRO SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS POR
PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS E FERTILIDADE EM SÊMEN
BOVINO *Bos taurus indicus***

***IDENTIFICATION OF MORPHOMETRIC SPERM SUBPOPULATIONS
AND FERTILITY IN *Bos taurus indicus* SEMEN***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de Setembro de 2016.

Prof. Dr. João Bosco Barreto Filho	UFLA
Prof. Dr. José Camisão de Souza	UFLA
Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini	USP

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales
Orientador

LAVRAS - MG

2016

Àqueles a quem tenho plena convicção de que nada seria possível sem eles. E que eu, por mais que me esforce, jamais conseguirei agradecer e retribuir tanto amor e dedicação a mim dispendidos. Aos meus amados pais, Marquinho e Luci, a quem tanto amo e admiro, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que além da vida, sempre foi infinitamente generoso comigo.

Às minhas queridas “santinhas”, Nossa Senhora Aparecida e Santa Rita, que nos momentos de maior dificuldade me carregaram no colo e intercederam por mim.

À minha mãe, Lucimar, fonte inesgotável de amor e dedicação. Se hoje subo mais um degrau é porque seus joelhos se mantiveram dobrados ao longo de todos esses anos. E isso me manteve de pé.

Ao meu pai, Marco Antonio, sem dúvidas, meu maior incentivador. Ele que, sem nunca perder a ternura, preparou-me para a vida e me ensinou a vivê-la com dignidade e honestidade.

Ao Marcelo, meu namorado e companheiro de vida, com quem dividi todas minhas angústias e aflições. Não tenho dúvidas de que a caminhada foi e, sempre será mais leve ao seu lado.

Às minhas queridas avós Fiinha e Aparecida, minha prima-irmã Luiza, assim como a todos os meus familiares, por tantos momentos doces compartilhados e pela certeza de nossa maior riqueza na vida: a família!

Aos amigos de Perdões, que sempre se fizeram presentes e tornam minha vida tão feliz e completa. Vocês fazem a diferença! Aos de Lavras, com quem vivi os melhores momentos da minha vida. Aos estagiários do CEBRA e LFRA e colegas pós-graduandos que tanto me ajudaram e com quem diariamente compartilhei alegrias e ansiedades. Especialmente à minha irmã da graduação e grande companheira da pós, Stenia, que tantas vezes compreendeu-me mais que eu mesma e foi meu maior apoio ao longo dos últimos sete anos.

Aos grandes mestres com quem tive o prazer de aprender um pouco a cada dia. Foi um prazer imensurável ser aprendiz de vocês. Ao João Bosco, com quem construí uma valiosa relação de amizade, agradecer apenas pelos

ensinamentos acadêmicos compartilhados nos últimos sete anos seria pouco. Acima de tudo, obrigada pelos ensinamentos de vida! Ao Zé Nélio que, além da orientação e incentivo constante, permitiu-me trabalhar com aquilo que gosto e faz meu coração vibrar e, dessa forma, “mergulhou” na andrologia junto comigo. Aos dois, além do muito obrigada, eu ainda digo: nossa jornada continua!

À Universidade Federal de Lavras, pela acolhida nos últimos sete anos e pelos próximos quatro que estão por vir. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e ao Laboratório de Reprodução Animal que, muitas vezes, foi minha segunda casa.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, durante esses dois anos de mestrado.

Ao Paulo Ossani, pela valiosa ajuda estatística, que descobriu o caminho das pedras e deu valor estatístico àquilo que nossa intuição já adiantava.

À Embrapa Gado de Leite, na pessoa do Dr. Luiz Sérgio, por permitir a realização da segunda parte do experimento. À analista Carolina, colegas pós-graduandos e estagiárias, que tanto me auxiliaram na realização da FIV.

À minha segunda irmã de Lavras, “Nataia” e aos seus pais, que me fizeram sentir em casa durante minha estadia em Juiz de Fora. Obrigada mesmo! Guardo vocês em um lugar especial no meu coração.

Por fim, mas não menos importante, ao meu irmão e anjo da guarda, Pedro Henrique, que cuida tão bem de mim e, em certo dia, fez questão de me “lembrar” de que tudo daria certo! Ele tinha razão... Hoje, gratidão me define.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação
e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e
vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.”*

José de Alencar

RESUMO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi identificar e classificar, por parâmetros de morfometria de cabeça dos espermatozoides, diferentes subpopulações espermáticas em sêmen congelado bovino e a relação da proporção relativa de células em cada uma delas com a fertilização *in vitro*. Para isso, amostras de sêmen de nove animais *Bos taurus indicus* (Nelore) foram descongeladas e imagens de 200 células por animal, consideradas com morfologia normal, foram adquiridas e tratadas no *software Image J*. Área, centro de massa e largura foram as variáveis utilizadas para a determinação das subpopulações. Amostras de sêmen da mesma partida, referentes a oito animais, foram utilizadas na fertilização *in vitro* de oócitos bovinos maturados e taxa de formação de pronúcleo foi avaliada, 20 horas após a fertilização, como avaliação da taxa de fertilidade. Quatro diferentes subpopulações foram identificadas, que se diferenciaram pela área da cabeça dos espermatozoides ($P < 0,05$), de modo que a quarta subpopulação (SP4), caracterizada pelas células de maior área de cabeça, apresentou-se majoritária (42,7% das células). Correlação negativa ($r = -0,91$; $P < 0,05$) foi encontrada entre a proporção relativa de células em SP4 e taxa de formação de pronúcleo. Em conclusão, sugere-se que a maior proporção de células de maior área de cabeça interfira negativamente na fertilização *in vitro*.

Palavras-chave: Espermatozoides. Bovino. Subpopulação. Fertilidade.

GENERAL ABSTRACT

The aim of the present work was to identify and classify, by means of morphometry parameters of spermatozoa heads, different sperm subpopulations in frozen bovine semen, as well as the relation of the relative cell population in each subpopulation with *in vitro* fertilization. For this, samples of the semen of nine *Bos taurus indicus* (Nelore) animals were thawed, subsequently obtaining images of 200 cells per animal, considered as presenting normal morphology, which were treated with the software Image J. The variables used for determining the subpopulations were area, mass center and width. Semen samples of the same lot, regarding eight animals, were used for the *in vitro* fertilization of mature bovine oocytes, evaluating the pronuclear formation rate 20 hours after fertilization, as fertility rate evaluation. Four different subpopulations were identified, differentiated by the head of the spermatozoa ($P < 0.05$), in order that the fourth subpopulation (SP4), characterized by cells with larger head area sperm, were majoritarian (42.7% of the cells). A negative correlation ($r = -0.91$; $P < 0.05$) was verified between the relative proportion of cells in SP4 and the pronuclear formation rate. In conclusion, we suggest that the higher proportion of cells of larger head area sperm cells negatively interfere with *in vitro* fertilization.

Keywords: Spermatozoa. Bovine. Subpopulation. Fertility.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Análise de Grupamento de Variáveis realizada a fim de evitar redundância entre as informações fornecidas.65
- Figura 2: Dendograma dos dados - Agrupamento hierárquico de Ward com distância Euclidiana.66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Configuração experimental para uso do equipamento Hamilton Thorne Biosciences (Ultimate Sperm Analyzer).....	57
Tabela 2 Valores médios dos parâmetros fornecidos pela Análise Computadorizada de sêmen (CASA) para todas as partidas de sêmen criopreservado de diferentes animais, oriundas de centrais de coleta e processamento de sêmen.	58
Tabela 3 Análise de correlação de Pearson entre as variáveis utilizadas para definição das subpopulações espermáticas, observadas em partidas de sêmen de touros da raça Nelore, oriundas de centrais de coleta e processamento de sêmen.	59
Tabela 4 Similaridade e distâncias entre os agrupamentos (subpopulações espermáticas) formados no agrupamento hierárquico de Ward, utilizando distância Euclideana.	60
Tabela 5 Proporção de espermatozoides e médias descritivas das variáveis dentro de cada subpopulação, avaliando todas as partidas conjuntamente (pixels).	61
Tabela 6 Efeito de diferentes proporções de espermatozoides com maior área de cabeça (SP4) na interação espermatozoide-oócito, usando sêmen congelado de touros da raça Nelore e oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i>	62
Tabela 7 Equação de regressão, R^2 , r , F e valor de P para Taxa de Formação de Pronúcleos	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ALH	Amplitude Lateral da Cabeça
ASMA	Análise Morfométrica Computadorizada
BCF	Frequência de Batimentos
CASA	Análise Computadorizada de Sêmen
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CCD	Charge Coupled Detector
CCO	Complexo Cúmulo-Oócito
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
Hz	Hertz
LIN	Linearidade
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MP	Membrana Plasmática
MP	Motilidade Progressiva
MT	Motilidade Total
PBS	Tampão Fosfato Salino
Pix ²	Pixels ao quadrado
PVA	Álcool Polivinílico
SP	Subpopulação
SVC	Soro de Vaca em Cio
TCM	<i>Tissue Culture Medium</i>
TFP	Taxa de Formação de Pronúcleos
UI	Unidades Internacionais
VAP	Velocidade do Trajeto
VCL	Velocidade Curvilínea
VGA	Análise de Variância de Grupo
VSL	Velocidade Progressiva

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
±	Mais ou Menos
µg	Micrograma
CO ₂	Dióxido de Carbono
G	Gramma
L	Litro
Ml	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Número
Nm	Nanometro
°C	Graus Celsius
P	Probabilidade
R	Correlação
R ²	Coefficiente de Determinação
X	Veze
\bar{X}	Média
µL	Microlitro

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	15
1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Aspectos estruturais da célula espermática	17
2.2 Avaliação das características físicas e morfológicas do espermatozoide	18
2.3 Avaliação da motilidade e morfologia espermática	19
2.4 Heterogeneidade do sêmen	21
2.5 Subpopulações espermáticas nas diferentes espécies animais	23
2.5.1 Suínos	23
2.5.2 Equinos	24
2.5.3 Ovinos	25
2.5.4 Bovinos	26
REFERÊNCIAS	29
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	35
ARTIGO 1 - IMPORTÂNCIA DA IDENTIFICAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS POR PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS SOBRE A FERTILIDADE <i>in vitro</i> DE SÊMEN BOVINO	35

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A análise de sêmen é parte fundamental para melhoria da eficiência reprodutiva e até recentemente era baseada em técnicas clássicas de microscopia, sendo determinados os principais parâmetros da amostra, tais como, concentração, motilidade e morfologia (ARRUDA et al., 2011). Porém, o espermograma realizado na rotina de avaliação pós-descongelamento não irá prever, *a priori*, o potencial fertilizante do ejaculado (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003, 2007). Geralmente, os níveis de fertilidade são estabelecidos após alto número de fêmeas serem inseminadas, o que embora seja eficiente, é dispendioso e demorado (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003). Por essa razão, a capacidade para pesquisar a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides *in vitro* aumentou consideravelmente, visando à estimativa de valores prognósticos (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003, 2007).

A fertilidade do macho é complexa e envolve uma série de fatores, que incluem população heterogênea de espermatozoides interagindo com o oócito e seu ambiente (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003). A heterogeneidade do sêmen é uma característica chave em ejaculados de mamíferos, constituído de diferentes subpopulações espermáticas (RAMÓN et al., 2013). Esse tipo de estudo parece promissor, já que as diferenças encontradas nas proporções relativas das subpopulações podem dizer a respeito de alterações fisiológicas e funcionais do sêmen (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2011).

A análise de *cluster* é uma técnica para avaliação de dados estatísticos que permite o agrupamento não supervisionado (sem um conjunto de dados *a priori* agrupados para orientar o agrupamento) de observações em subconjuntos, de modo que as observações do mesmo aglomerado são semelhantes em função de um dado critério (MARTINEZ-PASTOR et al., 2011). Dessa forma, a

presença das subpopulações espermáticas já foi descrita em diferentes espécies animais (FERRAZ et al., 2014; MAROTO-MORALEZ et al., 2012; MUIÑO et al., 2008, 2009; QUINTERO-MORENO et al., 2003; RUBIO-GUILLÉN et al., 2007; THURSTON et al., 2001), mas somente um número limitado de trabalhos pode ser encontrado na espécie bovina. Além disso, todos os trabalhos publicados, nessa espécie, referem-se a *Bos taurus taurus* e pouca atenção tem sido dada aos bovinos *Bos taurus indicus*.

No entanto, além da busca e classificação das diferentes subpopulações espermáticas, o interesse da pesquisa nas subpopulações vem no aumento das evidências de que elas tenham uma relevância funcional (YÁNIZ et al., 2015). Nesse sentido, o estudo mais detalhado do ejaculado e da proporção de células que compõe cada uma das subpopulações constitui uma ferramenta adicional e promissora na determinação do potencial de fertilidade de amostras de sêmen e, em longo prazo, de doadores de sêmen, *in vitro*, poupando tempo e trabalho que os métodos *in vivo* requerem.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos estruturais da célula espermática

O gameta masculino é formado a partir do desenvolvimento de células germinativas presentes no interior dos túbulos seminíferos em uma sequência de eventos denominada espermatogênese. Durante esse processo, as células germinativas vão se dividir mitoticamente para expandir o conjunto de espermatogônias e após duas divisões meióticas originarão espermatócitos e espermátides haploides, na fase denominada espermatocitogênese. Subsequentemente, na espermiogênese, as espermátides sofrerão remodelações morfológicas e moleculares, originando células maduras, na forma de espermatozoides (BARTH; OKO, 1989; EDDY, 2006). O espermatozoide é uma célula haploide altamente diferenciada, formado por cabeça e cauda (flagelo), que são unidos pelo colo (LUQUE; BÁO, 2006; TOSHIMORI, 2009), e totalmente recoberto pela membrana plasmática, seu componente mais externo (LUQUE; BÁO, 2006).

O formato da cabeça e as dimensões do espermatozoide variam segundo a espécie, sendo que nos bovinos, possui forma arredondada e achatada. A cabeça espermática compreende o núcleo, o acrossoma, e pequeno volume de citoplasma organizado em camadas citoplasmáticas. O núcleo, responsável pela maior parte da cabeça, é revestido pelo envoltório nuclear e formado por massa compacta de DNA, a cromatina. O acrossoma, estrutura semelhante a um capuz, recobre a região proximal da cabeça. É inteiramente recoberto pela membrana acrossomal, que contém enzimas hidrolíticas, tais como hialuronidase e acrosina, responsáveis pela destruição do *cumulus oophorus* e da zona pelúcida do oócito durante a fecundação (TOSHIMORI, 2009).

O flagelo ou cauda é composto pela peça intermediária, peça principal e peça terminal (LUQUE; BÁO, 2006; TOSHIMORI, 2009), sendo constituído

por dois microtúbulos centrais circundados por nove microtúbulos duplos. Circundando essa estrutura, existem outras nove formações, as fibrilas densas externas. Revestindo a peça intermediária, existem as bainhas mitocondrial e fibrosa (LUQUE; BÁO, 2006). A movimentação da cauda se dá pelo deslizamento entre os microtúbulos, cuja energia é proveniente da bainha de mitocôndrias que recobre a peça intermediária (TURNER, 2006). A peça principal se estende do *anulus* até a peça terminal. A bainha mitocondrial desaparece e duas colunas de fibra densa são substituídas por duas colunas longitudinais de bainha fibrosa. Dessa forma, ocorre redução no número de colunas de fibra densa, passando de nove para sete. A porção final do flagelo é chamada de peça terminal e contém apenas o axonema circundado pela membrana plasmática (LUQUE; BÁO, 2006).

Fisiologicamente, o objetivo final da célula espermática é empreender sucesso na fertilização do oócito, resultando em concepção normal. No entanto, somente o espermatozoide competente, que passa pelo processo de capacitação e reação acrossomal, sofrendo todas as alterações funcionais e estruturais normais, se torna apto a fecundar o oócito (GADELLA et al., 2001).

2.2 Avaliação das características físicas e morfológicas do espermatozoide

A contribuição do sêmen para a eficiência reprodutiva é fundamental, bem como sua avaliação prévia (ARRUDA et al., 2011). A avaliação *in vitro* de sêmen bovino pós-criopreservação busca identificar amostras de ejaculados que possuam espermatozoides morfofisiologicamente intactos, incluindo parâmetros como concentração espermática, motilidade progressiva, integridade morfológica e viabilidade celular (GILLAN et al., 2008; JANUSKAUSKAS; ZILINSKAS, 2002; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). A seleção de amostras de sêmen bovino após descongelação é realizada julgando-se a motilidade progressiva, que expressa a porcentagem de espermatozoides com movimentos

progressivos, o vigor, representando a intensidade com que as células se movem e, por fim, o total de espermatozoides anormais conforme as características apresentadas pelos mesmos (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2013). No entanto, nenhum teste laboratorial isolado pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen, uma vez que, para serem capazes de fertilizar o oócito e permitir o desenvolvimento embrionário, os espermatozoides precisam apresentar diversas características dentro da normalidade fisiológica (ARRUDA, 2000; ARRUDA; CELEGHINI, 2003; BRAUNDMEIER; MILLER, 2001).

2.3 Avaliação da motilidade e morfologia espermática

A motilidade espermática é o parâmetro mais comumente utilizado para analisar o potencial de fertilidade do sêmen, uma vez que a célula espermática necessita estar móvel para migrar ao longo do trato reprodutivo feminino e promover a fertilização do oócito (GILLAN et al., 2008; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). É classificada de acordo com a porcentagem de células espermáticas com movimento progressivo e com qualidade do movimento, que envolve a velocidade de movimento linear, distância total e progressão (JANUSKAUSKAS; ZILINSKAS, 2002). Usualmente, a motilidade espermática é estimada em análise do sêmen entre lâmina e lamínula por microscopia óptica. Esse método é uma forma indireta de avaliação simples e de baixo custo, no entanto, apresenta grande variabilidade (ARRUDA et al., 2011).

A avaliação subjetiva da motilidade espermática pode determinar variações, de acordo com a experiência do avaliador, ocasionando diferenças nos valores para um mesmo parâmetro (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; OCLIN, 2002). Assim, para estabelecer um padrão objetivo de avaliação seminal foram desenvolvidos sistemas automáticos de análise de sêmen (CASA). A avaliação pelo CASA apresenta maior padronização, precisão, confiabilidade e velocidade

na obtenção de resultados nas análises (MATOS; ARAÚJO; ROBERTO, 2008; VERSTEGEN; IGUER-OUADA; OCLIN, 2002). Dessa forma, o CASA é a um sistema automatizado (*Hardware e Software*) para visualizar e digitalizar imagens sucessivas dos espermatozoides, processando, analisando e fornecendo informações acuradas, precisas e significativas da cinética individual das células, e também valores estatísticos médios sumarizados da população global (AMANN; KATZ, 2004). Esse tipo de avaliação determina não somente a porcentagem de células móveis, mas também quantifica características específicas do movimento espermático (GARNER et al., 1997), tais como: velocidade do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral da cabeça (ALH), frequência de batimentos (BCF), linearidade (LIN).

Além da motilidade, o exame morfológico da célula espermática tem sido utilizado de forma rotineira para seleção e controle de sêmen (ARRUDA et al., 2011). Na avaliação de rotina das características morfológicas dos espermatozoides, duas técnicas principais podem ser utilizadas: esfregaços corados avaliados em microscópio de campo claro e preparação úmida avaliada em microscópio de contraste de fase ou contraste de interferência diferencial (CBRA, 2013). Para morfologia espermática, inicialmente, classificaram-se as anormalidades espermáticas de acordo com a sua origem, em defeitos primários, secundários e terciários (LANGERLOF, 1934). Uma segunda classificação propôs associação ao grau de importância do defeito para a fertilidade em defeitos maiores e menores (BLOM, 1973). Além disso, há classificação baseada nas características espermáticas importantes para o processo de fertilização *in vivo*, sendo os defeitos denominados compensáveis e não compensáveis (SAACKE, 1998).

Alguns estudos têm demonstrado que a morfologia espermática, incluindo a porcentagem de acrossomas intactos, é importante indicador da

aptidão reprodutiva (FRENEAU et al., 2011; OSTERMEIER et al., 2001; SAACKE et al., 2000). A alta frequência de espermatozoides morfológicamente anormais ou a alta incidência de um único defeito parecem reduzir taxas de fertilidade (ARRUDA et al., 2011). Em geral, as características desejáveis referentes à morfologia para sêmen bovino congelado são de no mínimo 70% de células normais, sendo a tolerância para os defeitos maiores de até 10%, enquanto defeitos individuais podem aparecer em até 5% (CBRA, 2013).

2.4 Heterogeneidade do sêmen

Espermatozoides são as células com maior diversidade morfológica conhecida. Quando se trata de variações intraespecíficas e dentro do mesmo ejaculado, embora as diferenças sejam sutis e imperceptíveis ao olho humano, alguns trabalhos têm demonstrado a presença de diferentes grupamentos celulares (MAROTO-MORALEZ et al., 2012; MUIÑO et al., 2008; PEÑA et al., 2005; RAMÓN et al., 2013). As diferenças interespecíficas já foram definidas e acredita-se que representem importantes ferramentas do ponto de vista evolutivo, de forma que a seleção favoreça diferentes tipos de células espermáticas, o que varia de acordo com o ambiente no qual elas serão lançadas (RAMÓN et al., 2014). Embora alguns resultados tenham sido contraditórios (GAGE et al., 2004; HUMPHRIES; EVANS; SIMMONS, 2008), há evidências de que o tamanho e a forma dos espermatozoides estejam envolvidos na competição espermática e fertilização em diferentes espécies, como em ouriço do mar (FITZPATRICK; GARCIA-GONZALEZ; EVANS, 2010), anfíbios (BYRNE; SIMMONS; ROBERTS, 2003), pássaros (BENNISON et al., 2015) e mamíferos poligâmicos (TOURMENTE; GOMENDIO; ROLDAN, 2011). Acredita-se que quanto maior o ambiente competitivo, maiores serão os espermatozoides e sua velocidade de deslocamento. Por outro lado, homens mais

férteis apresentaram espermatozoides significativamente menores que os demais (AZIZ et al., 1998).

Como a origem das subpopulações ainda não está clara é provável que a seleção natural atue de maneira importante na formação das subpopulações espermáticas. Além disso, é possível que esses grupamentos correspondam a diferenças na produção individual dos espermatozoides, durante as diferentes ondas espermatogênicas, bem como a diferenças no seu estado maturacional e tempo de armazenamento na cauda do epidídimo até o momento da ejaculação (ABAIGAR et al., 1999; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, 2007).

Aceitar que o ejaculado seja composto por diferentes tipos de espermatozoides significa que as células espermáticas podem ser divergentes tanto no seu padrão de movimentação quanto na sua morfologia, e, por isso, as subpopulações podem ser classificadas por parâmetros cinéticos e morfométricos. A heterogeneidade do sêmen tem sido relatada por ambos os parâmetros nas espécies domésticas, como suínos (PEÑA et al., 2005; RAMÍO et al., 2008; THURSTON et al., 2001), equinos (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009; QUINTERO-MORENO et al. 2003), ovinos (BRAVO et al., 2011; MAROTO-MORALEZ et al., 2012; MARTÍ; APARICIOB; GARCÍA-HERREROSC, 2011) e bovinos (FERRAZ et al., 2014; RUBIO-GUILLÉN et al., 2007; MUIÑO et al., 2008, 2009), além das espécies selvagens, como cervos (RAMÓN et al., 2013) e primatas (VALLE et al., 2012, 2013). Além disso, salvo alguns estudos (NUNEZ-MARTINEZ; MORAN; PEÑA, 2007; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009; VALLE et al., 2013), a maioria dos trabalhos relata o número de grupamentos celulares variando entre três e quatro subpopulações (MARTINEZ-PASTOR et al., 2011).

Além de identificar a presença das subpopulações, existe necessidade de esclarecer o seu significado e testar o seu papel fisiológico. Embora ainda existam poucos trabalhos nesse sentido, alguns autores encontraram relações

positivas e negativas entre a proporção de células em cada agrupamento com a criopreservação do sêmen (RUBIO-GUILLÉN et al., 2007; THURSTON et al., 2001). Correlações positivas foram encontradas entre a morfometria das células e taxa de fertilidade em cervídeos (RAMÓN et al., 2013) e carneiros (YÁNIZ et al., 2015). Tendo em vista as lacunas de conhecimento que ainda se fazem presentes nesse assunto e os resultados até então encontrados, estudar e melhor entender a estrutura heterogênea que compõe os ejaculados nas diferentes espécies animais representa questão-chave para melhor compreender o desempenho reprodutivo masculino.

2.5 Subpopulações espermáticas nas diferentes espécies animais

As subpopulações espermáticas já foram descritas nas diferentes espécies de animais domésticos, como suínos (PEÑA et al., 2005; RAMÍO et al., 2008; THURSTON et al., 2001), equinos (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009; QUINTERO-MORENO et al. 2003), ovinos (BRAVO et al., 2011; MAROTO-MORALEZ et al., 2012; MARTÍ; APARICIOB; GARCÍA-HERREROSC, 2011) e bovinos (FERRAZ et al., 2014; RUBIO-GUILLÉN et al., 2007; MUIÑO et al., 2008, 2009), tanto por parâmetros cinéticos, quanto morfométricos.

2.5.1 Suínos

Três subpopulações espermáticas, morfometricamente distintas, em sêmen fresco suíno foram identificadas pela análise dos componentes principais (THURSTON et al., 2001). Alta variabilidade na frequência das células que compunham os agrupamentos em análise interanimal foi encontrada, o que não aconteceu em diferentes ejaculados do mesmo doador, sugerindo que a estrutura da heterogeneidade do sêmen permaneça constante no mesmo animal. Foi observada correlação positiva entre a proporção de células pertencentes à terceira subpopulação, caracterizadas por cabeças afinadas, com motilidade

linear progressiva e proporção de espermatozoides com membrana plasmática intacta pós-congelação. Por outro lado, animais que possuíam maior proporção de células pertencentes à primeira subpopulação, caracterizadas por cabeças com formato retangular, apresentaram correlação negativa para os mesmos parâmetros. Esses resultados sugerem que, em suínos, a heterogeneidade do ejaculado e a proporção de células que compõem as subpopulações encontradas parecem estar relacionadas ao sucesso da criopreservação do sêmen.

No mesmo sentido, quatro subpopulações espermáticas morfometricamente distintas entre si submetidas à Análise Morfométrica Computadorizada (ASMA) nas frações pobre e rica do ejaculado suíno foram encontradas, sendo que a proporção de células em cada subpopulação variou entre os animais e entre as diferentes porções (PEÑA et al., 2005).

Em relação aos parâmetros cinéticos, quatro grupamentos celulares distintos, avaliados pelo CASA, foram encontrados (RAMIÓ et al., 2008). Houve diferença significativa nos padrões de movimento em cada grupo, bem como na proporção de células que compunham cada subpopulação após os processos de capacitação espermática e reação acrossômica induzida *in vitro*. Dessa forma, a quarta subpopulação, representada pelos maiores valores de velocidade e retilinearidade, aumentou consideravelmente após a capacitação. No entanto, o número de grupamentos celulares se manteve constante, sugerindo que a manutenção da estrutura das subpopulações parece ser importante no controle de toda a fisiologia do ejaculado.

2.5.2 Equinos

Quatro *clusters* celulares com padrões de movimento distintos, avaliados pelo CASA, foram identificados em sêmen fresco e após vinte e quatro horas de resfriamento em garanhões (QUINTERO-MORENO et al., 2003). Houve diferença significativa na proporção das subpopulações, bem como nos valores

de motilidade total e quantidade de células por *cluster*. Além disso, embora com diminuição do total de movimento progressivo, após vinte e quatro horas de resfriamento, as quatro subpopulações foram mantidas. Por outro lado, parece haver diminuição no número de subpopulações no sêmen equino após o congelamento (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009). Diferente do encontrado nas outras espécies domésticas, seis subpopulações com padrões de movimento diferentes foram encontrados em sêmen fresco equino, enquanto após a criopreservação, o número de agrupamentos diminuiu para quatro (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009).

2.5.3 Ovinos

Cinco subpopulações espermáticas diferentes avaliadas em relação aos parâmetros cinéticos pelo CASA foram identificadas em sêmen fresco de carneiros (BRAVO et al., 2011). Diferentemente de trabalhos anteriores já citados, a frequência de distribuição dos espermatozoides dentro das subpopulações foi muito semelhante entre os seis animais analisados. Além disso, a estrutura das cinco subpopulações que compõem a heterogeneidade do sêmen se manteve estável durante as diferentes estações do ano. Em relação aos parâmetros morfométricos avaliados em sêmen congelado de carneiros, pela Análise Morfométrica Computadorizada (ASMA), três grupos celulares distintos foram encontrados em animais jovens e quatro em animais maduros sexualmente, sugerindo que a estrutura da heterogeneidade do sêmen se altere em decorrência da maturidade sexual e idade dos animais (MARTÍ; APARICIOB; GARCÍA-HERREROSC, 2011). A presença de quatro *clusters* celulares morfometricamente distintos em animais adultos foi posteriormente confirmada (MAROTO-MORALES et al., 2012).

Semelhantemente à espécie suína (THURSTON et al., 2001), em ovinos a estrutura das subpopulações permanece constante dentro do mesmo animal,

com baixa variabilidade (10-20%) quando diferentes ejaculados de um único doador de sêmen foram avaliados (MAROTO-MORALES et al., 2012). No entanto, houve alta variação entre os machos (50-70%), o que facilitaria futuros diagnósticos de aptidão reprodutiva de doadores de sêmen levando em consideração a heterogeneidade do sêmen.

Em relação à fertilidade, três diferentes subpopulações espermáticas foram identificadas por parâmetros cinéticos e morfométricos em carneiros de alta e baixa fertilidade a campo. Nesse sentido, animais com maiores taxas de fertilidade eram caracterizados por altas proporções de células rápidas e lineares (SP2 cinética) e espermatozoides largos e longos (SP3 morfométrica; YÁNIZ et al., 2015), corroborando a ideia de que a estrutura da heterogeneidade do sêmen parece estar relacionada ao sucesso da fertilização.

2.5.4 Bovinos

Três e quatro subpopulações espermáticas significativamente diferentes, variando conforme as dimensões e formato da cabeça dos espermatozoides (área, comprimento, largura, perímetro, comprimento/largura, elipicidade, rugosidade, alongação e regularidade) foram encontradas em sêmen fresco e criopreservado de bovinos europeus (RUBIO-GUILLÉN et al., 2007; VALVERDE et al., 2016). A proporção relativa de células em SP1, caracterizada por células de maior dimensão (área de $42.02\mu\text{m}^2 \pm 2.4$), diminuiu após a congelação, enquanto SP2, composta por células menores ($32.15\mu\text{m}^2 \pm 2.4$), e SP3, composta por espermatozoides com dimensões médias ($38.10\mu\text{m}^2 \pm 1.8$) aumentaram (RUBIO-GUILLÉN et al., 2007). Esses resultados sugerem que a sensibilidade frente ao congelamento e as diferenças encontradas em diferentes animais na criopreservação do sêmen possam ser explicadas pela heterogeneidade do sêmen. Além disso, observou-se distribuição das

subpopulações variando entre animais, ejaculados e, inclusive, entre palhetas em alguns animais (VALVERDE et al., 2016).

Em relação aos parâmetros cinéticos, quatro diferentes subpopulações foram encontradas em sêmen fresco e congelado de touros Holandês e Asturiana dos Vales, avaliados pelo CASA e análise de grupamento MULTIVARIADA (MUIÑO et al., 2008, 2009). Esses autores relataram que a proporção de espermatozoides dentro de cada subpopulação foi alterada durante a criopreservação, de modo que a SP4, caracterizada por células com movimento rápido e progressivo, diminuiu após a criopreservação. No entanto, diferentemente de outras espécies, a distribuição dos subgrupos foi semelhante entre os touros analisados, tanto no sêmen fresco quanto no congelado, sendo as diferenças entre os animais quase que exclusivamente pela porcentagem de células em SP4 (MUIÑO et al., 2008, 2009). Dessa forma, acredita-se que as diferenças na proporção de células que compõem a SP4 poderiam justificar diferenças na fertilidade de doadores de animais. Nesse sentido, correlações positivas foram encontradas entre a proporção de células em SP4 e número de espermatozoides ligados à zona pelúcida, taxa de penetração e taxa de formação de pronúcleo avaliados *in vitro* ($r=0,79$; $r=0,66$ e $r=0,63$; respectivamente), quando quatro agrupamentos celulares definidos por parâmetros cinéticos também foram identificados em sêmen congelado de bovinos *Bos taurus taurus* (FERRAZ et al., 2014). Esses resultados ressaltam a importância de considerar a heterogeneidade do sêmen na avaliação de animais com melhor aptidão reprodutiva.

REFERÊNCIAS

- ABAIGAR, T. et al. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazelladama horri*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. **Biology of Reproduction**, New York, v. 60, n. 1, p. 32-41, Jan. 1999.
- AMANN, R.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 317-325, Jun. 2004.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfologia (ASMA)**. 2000. 121 p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 145-151, abr./jun. 2011.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, p. 230-231, 2003. Suplemento.
- AZIZ, N. et al. Human sperm head morphometric distribution and its influence on human fertility. **Fertility and Sterility**, New York, v. 70, n. 5, p. 883-891, Nov. 1998.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285 p.
- BENNISON, C. et al. Long sperm fertilize more eggs in a bird. **Proceedings Royal Society Biology**, London, v. 282, n. 1799, p. 20141897, Jan. 2015.
- BLOM, E. Ultra structure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, Copenhagen, v. 25, n. 7, p. 383-391, July/Aug. 1973.
- BRAUNDMEIER, A. G.; MILLER, D. J. The search in on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 84, n. 9, p. 1915-1925, Sept. 2001.

BRAVO, J. A. et al. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 129, n. 1/2, p. 22-29, Nov. 2011.

BYRNE, P. G.; SIMMONS, L. W.; ROBERTS, J. D. Sperm competition and the evolution of gamete morphology in frogs. **Proceedings Biological Science**, London, v. 270, n. 1528, p. 2079–2086, Oct. 2003.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.

EDDY, E. M. The spermatozoon. In: NEL, J. D. et al. **Knobil and neill's physiology of reproduction**: volume 1. London: Elsevier, 2006. p. 3–54.

FERRAZ, M. A. M. M. et al. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm–oocyte interaction of frozen-thawed sêmen from Holstein bulls. **Theriogenology**, Los Altos, v. 81, n. 8, p. 1067-1072, May 2014.

FITZPATRICK, J. L.; GARCIA-GONZALEZ, F.; EVANS, J. P. Linking sperm length and velocity: the importance of intra male variation. **Biology Letters**, London, v. 6, n. 6, p. 797–799, Dec. 2010.

FRENEAU, G. E. et al. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 160-170, abr./jun. 2011.

GADELLA, B. M. et al. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, n. 3/4, p. 249-265, Dec. 2001.

GAGE, M. J. G. et al. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic Salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. **Current Biology**, London, v. 14, n. 1, p. 44-47, Jan. 2004.

GARNER, D. L. et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 57, n. 6, p. 1401-1406, Dec. 1997.

GILLAN, L. et al. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 103, n. 3/4, p. 201-214, Jan. 2008.

HUMPHRIES, S. T.; EVANS, J. P.; SIMMONS, L. W. Sperm competition: linking form to function. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 8, p. 319–329, Nov. 2008.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. **Veterinarijair Zootechnika**, Kaunas, v. 17, n. 39, p. 1-8, Apr. 2002.

LAGERLOF, N. Morphologische untersuchungen uber veranderingen in der spermabildung und in den hoden bei bullen mit verminderter oder aufgehobener fertilitat. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 1, suppl. 19, p. 254, 1934.

LUQUE, M. C.; BÁO, S. N. Structural and ultrastructural characterization of zebu (*Bos indicus*) spermatozoa. **Biocell**, Mendoza, v. 30, n. 1, p. 33-38, Apr. 2006.

MAROTO-MORALES, A. et al. Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in ram ejaculates: Intra- and interindividual variation. **Theriogenology**, Los Altos, v. 77, n. 8, p. 1529–1539, May 2012.

MARTÍ, J. I.; APARICIOB, I. M.; GARCÍA-HERREROS, M. Sperm morphometric subpopulations are differentially distributed in rams with different maturity age in cryopreserved ejaculates. **Theriogenology**, Los Altos, v. 76, n. 1, p. 97–109, July 2011.

MARTÍNEZ-PASTOR, F. et al. Statistical series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. **Theriogenology**, Los Altos, v. 75, n. 5, p. 783–95, Mar. 2011.

MATOS, D. I.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, L. G. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 225-232, out./dez. 2008.

MUIÑO, R. et al. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. **Theriogenology**, Los Altos, v. 72, n. 6, p. 860-868, Oct. 2009.

MUIÑO, R. et al. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 109, n. 1/4, p. 27-39, Dec. 2008.

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

ORTEGA-FERRUSOLA, C. et al. Identification of sperm subpopulations in stallion ejaculates: changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, n. 3, p. 419–423, June 2009.

OSTERMEIER, G. C. et al. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 22, n. 4, p. 595-603, July/Aug. 2001.

PEÑA, F. J. et al. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to post thaw quality. Philadelphia, v. 26, n. 6, p. 716-723, Nov/Dec. 2005.

QUINTERO-MORENO, A. et al. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology**, Los Altos, v. 59, n. 9, p. 1973-1990, May 2003.

RAMIÓ, L. et al. Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to “in vitro” capacitation and further “in vitro” acrosome reaction. **Theriogenology**, Los Altos, v. 69, n. 4, p. 501–512, Mar. 2008.

RAMÓN, M. et al. Sperm population structure and male fertility: an intraspecific study of sperm design and velocity in red deer. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 89, n. 5, p. 1/7, Nov. 2013.

RAMÓN, M. et al. Understanding sperm heterogeneity: biological and practical implications. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 49, n. 4, p. 30-36, Oct. 2014.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction Domestic Animal**, Berlin, v. 38, n. 4, p. 312-318, Aug. 2003.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. State of the art in farm animal sperm evaluation. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 19, n. 1, p. 1-11, Jan. 2007.

RUBIO-GUILLÉN, J. et al. Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 42, n. 4, p. 354-57, Aug. 2007.

SAACKE, R. G. AI fertility: are we getting the job done? In: NAAB TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 1998, Madison. **Proceedings...** Columbia: National Association of Animal Breeders, 1998. v. 17, p. 6-12.

SAACKE, R. G. et al. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60/61, p. 663-677, Jan. 2000.

THURSTON, L. M. et al. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 22, n. 3, p. 382-394, May/June 2001.

TOSHIMORI, K. **Dynamics of the mammalian sperm head: modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation**. Berlin: Springer-Verlag, 2009. 98 p.

TOURMENTE, M.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. S. Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 11, p. 12-21, Jan. 2011.

TURNER, R. M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. **Reproduction, Fertility, and Development**, East Melbourne, v. 18, n. 1/2, p. 25-38, Jan. 2006.

VALLE, R. R. et al. Identification of sperm Head subpopulations with defined pleiomorphic characteristics in ejaculates of captive Goeldi's monkeys (*Callimico goeldii*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 137, n. 1/2, p. 93-102, Feb. 2013.

VALLE, R. R. et al. Sperm head morphometry in ejaculates of adult marmosets (*Callithrix jacchus*): a model for studying sperm subpopulations and among-donor variations. **Theriogenology**, Los Altos, v. 78, n. 5, p. 1152–1165, Sept. 2012.

VALVERDE, A. et al. Morphometry and subpopulations structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws. **Asian Journal of Andrology**, Beijing, v. 18, p. 1-7, Oct. 2016.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, Los Altos, v. 57, n. 1, p. 149-179, Jan. 2002.

YÁNIZ, J. L. et al. Sperm population structure in high and low field fertility rams. **Animal Reproduction Science, Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 156, p. 128-134, May 2015.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 - IMPORTÂNCIA DA IDENTIFICAÇÃO DE
SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS POR PARÂMETROS
MORFOMÉTRICOS SOBRE A FERTILIDADE *in vitro* DE SÊMEN
BOVINO**

Artigo formatado segundo as normas da *Theriogenology* (Versão preliminar)

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar subpopulações espermáticas (SP) definidas por morfometria de cabeça de espermatozoides em sêmen congelado bovino e a relação da proporção relativa de células em cada uma delas com a fertilização *in vitro*. Nove partidas de sêmen referentes a nove diferentes touros da raça Nelore (N=9) foram descongeladas (37°C/30 segundos), avaliadas e os espermatozoides foram fixados em solução formol salina. Imagens de 200 células normais por partida foram adquiridas e tratadas no software Image J. Área, centro de massa e largura foram as variáveis utilizadas para determinação das subpopulações. Amostras de sêmen da mesma partida, referentes a oito dos nove animais, foram utilizadas na fertilização *in vitro* de oócitos bovinos maturados e taxa de formação de pronúcleos (TFP) foi avaliada em microscopia de fluorescência 20 horas após a fertilização, como avaliação da taxa de fertilidade *in vitro*. Três repetições por partida foram realizadas (N=24). Para determinação das subpopulações, análise multivariada foi feita utilizando agrupamento hierárquico de Ward com distância Euclidiana e a determinação do número ótimo de subpopulações pela análise do comportamento do nível de distância e similaridade. Método *k-means* foi aplicado na partição de cada subpopulação. A validação dos grupamentos para verificação da diferença entre as médias das variáveis foi feita pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Análise de regressão linear entre a proporção de espermatozoides em cada subpopulação e TFP foi calculada. Análise estatística foi realizada no programa Minitab 17.1.0 e software R versão 3.3.1, pacote MVar.pt versão 1.9.4. Quatro subpopulações (SP1, SP2, SP3 e SP4) foram determinadas, que diferiram em relação à área da cabeça dos espermatozoides. SP4, subpopulação composta pelos espermatozoides de maior área ($\bar{X} = 1075,51 \pm 49,03 \text{ pix}^2$), apresentou-se majoritária com 43% das células, enquanto SP1

($\bar{X}=966 \pm 66,8 \text{ pix}^2$), SP2 ($\bar{X}=981,84 \pm 69,27 \text{ pix}^2$) e SP3 ($\bar{X}=1007,99 \pm 82,91 \text{ pix}^2$) apresentaram distribuição relativa das células equivalente (21%; 17,5%; 18,5%; respectivamente). Verificou-se correlação negativa ($r= -0,91$; $P= 0.0108$) entre o número relativo de células em SP4 e TFP. Conclui-se que partidas de sêmen de *Bos taurus indicus* com maior proporção relativa de espermatozoides com maior área de cabeça possuem menor capacidade de fertilização *in vitro*.

Palavras-chave: espermatozoide, touro, subpopulação, FIV.

Abstract

This study determined the presence of sperm subpopulations (SP) defined by morphometry parameters of sperm head in frozen bovine semen Nellore and its influence in vitro fertilization. Nine semen straws were thawed in a water bath at (37 ° C/30 seconds) and fixed in buffered formal saline. Two hundred images of normal cells per animal were acquired by a CCD camera attached to a microscope and computer. The images were treated in the software Image J, generating data on the morphometry of the sperm head. Multivariate analysis was performed using the Ward hierarchical clustering technique with Euclidean distance and determining the optimal number of groups by analysis of the level of distance and similarity behavior. K-means method was applied in the partition of each subpopulation. The validation of groups in order to check the difference among variables averages was taken by Tukey test ($P < 0.05$). Semen samples from the same starting for eight animals were used for in vitro fertilization of matured oocytes from slaughterhouse ovaries. Twenty hours after fertilization, the potential zygotes were fixed in 4% paraformaldehyde, stained with Hoechst 33342 (5 μ g/ml) and pronuclear formation rate (TFP) was evaluated by epifluorescence microscopy in order to determine the fertilization rate. Three repetitions per animal were performed. The correlation among the proportion of sperm in each subpopulation and pronuclear formation rate was calculated. Statistical analysis was performed in Minitab 17.1.0 program and software R version 3.3.1, MVar.pt package version 1.9.4. Four subpopulations (SP1, SP2, SP3 and SP4) were determined, which differed in relation to the sperm head area. SP4, subpopulation composed of sperm larger area ($x = 1075.51 \pm 49.03 \text{ pix}^2$) showed up the majority with 43% of the cells, while SP1 ($X = 966 \pm 66.8 \text{ pix}^2$), SP2 ($X = 981.84 \pm 69.27 \text{ pix}^2$) and SP3 ($x = 1007.99 \pm 82.91 \text{ pix}^2$) showed relative distribution of equivalent cells (21%, 17.5%, 18.5%, respectively).

Negative correlation was found ($r = -0.91$; $P = 0.0108$) between the relative number of cells in SP4 and TFP. It follows that *Bos indicus* semen matches with a higher relative proportion of sperm with increased head area have lower capacity for in vitro fertilization.

Keywords: sperm, bovine, subpopulation, fertility.

1. Introdução

O objetivo final das avaliações de sêmen criopreservado é determinar seu potencial de fertilidade. No entanto, embora a capacidade de avaliação da integridade funcional e estrutural dos diferentes compartimentos das células espermáticas tenha aumentado consideravelmente nos últimos anos, determinar o potencial reprodutivo de uma partida de sêmen permanece desafiador [1-3].

Estudos têm demonstrado que a principal razão para a baixa eficiência na predição do potencial fertilizante seria considerar uma solução homogênea de espermatozoides, já que células espermáticas de um mesmo ejaculado apresentam distintos padrões de movimento e morfometria [1,2]. Como a maioria dos trabalhos que correlacionam fertilidade e qualidade do sêmen não leva em consideração a heterogeneidade dos espermatozoides e utilizam valores médios dos parâmetros, esses podem não ser representativos da amostra analisada [2]. Dessa forma, análise mais detalhada das células espermáticas que compõem o ejaculado permite nova abordagem na avaliação da fertilidade do ejaculado e por consequência, de doadores de sêmen.

A presença das subpopulações espermáticas definidas por parâmetros cinéticos e morfométricos tem sido relatada nas diferentes espécies domésticas [3-9]. No entanto, na espécie bovina estudos sobre subpopulações, principalmente por diferenças baseadas na morfometria da cabeça dos espermatozoides, assim como seu significado biológico, permanecem escassos.

A fertilidade do sêmen pode ser estimada pela capacidade da célula espermática penetrar em oócitos homólogos e heterólogos *in vitro* [10-12]. No entanto, em apenas um estudo foi avaliada a correlação entre a proporção relativa de células nas subpopulações espermáticas encontradas e fertilidade, no qual verificou-se correlação positiva entre a proporção de células rápidas e progressivas com o número de espermatozoides ligados à zona pelúcida, taxa de

penetração e taxa de formação de pronúcleo ($r= 0,79$; $r= 0,66$; $r= 0,63$; respectivamente) [9]. Dessa forma, não existem estudos que correlacionaram a presença de subpopulações determinadas por parâmetros morfométricos da cabeça dos espermatozoides com fertilização na espécie bovina. Assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar subpopulações espermáticas por parâmetros morfométricos em sêmen congelado bovino de *Bos taurus indicus* e avaliar a influência da proporção relativa de células nas subpopulações identificadas na fertilidade *in vitro*.

2. Material e Métodos

2.1. Experimento 1: Identificação de subpopulações espermáticas morfometricamente distintas em sêmen congelado bovino de *Bos taurus indicus*

2.1.1. Amostras de Sêmen e Local de Realização do Estudo

Nove palhetas de sêmen congelado, oriundas da mesma partida de diferentes touros da raça Nelore (N=9) em idade reprodutiva e residentes em centrais de congelação e processamento de sêmen, foram utilizadas no estudo. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

2.1.2. Preparação e Análise de Sêmen

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C durante 30 segundos. A análise da motilidade foi realizada no Computer-Assisted Sperm

Analysis (CASA, Sperm Analysis System, Ivos-Ultimate 12's, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA), com *setup* previamente ajustado para análise de espermatozoide bovino (Tabela 1). Para avaliação, 9 μL de sêmen diluído em meio TALP na concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL foram colocados na lâmina de leitura (Makler, Santa Ana, CA, USA) aquecida. No mínimo três campos foram selecionados manualmente para leitura e análise. Os parâmetros de cinética espermática mensurados foram: motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) em percentagem; velocidade de trajeto (VAP), velocidade retilínea (VSL), e velocidade curvilínea (VCL) em micrômetro por segundo; amplitude lateral de cabeça (ALH) em micrômetro; frequência de batimentos (BCF) em Hz; e linearidade (LIN) em percentagem.

Uma alíquota de 50 μl de sêmen foi adicionada em tubo de microcentrífuga contendo 100 μL de solução formol-salina. Desse total, 10 μL da solução foram colocados entre lâmina e lamínula para aquisição de 200 células por partida consideradas com morfologia normal. Foi utilizada microscopia de luz (Olympus BX41) com filtro verde para melhorar o contraste de imagem (Olympus IF550), acoplado em câmara CCD (Charge Coupled Detector - SDC-415, Samsung) conectada a um computador para armazenamento das imagens produzidas, em formato "bmp". Os espermatozoides foram centralizados na tela, em aumento de 400X, inspecionados visualmente para assegurar que estivessem nos mesmos planos do foco e com a menor quantidade possível de artefatos.

2.1.3. Processamento das imagens

A análise das imagens dos espermatozoides foi realizada com o uso do Image J (*National Institutes of Health - NIH*). As imagens foram tratadas para apresentar oito bits. O ajuste na imagem foi realizado pela ferramenta "Threshold", que faz com que permaneçam somente os pixels que delimitam o contorno da célula. Após esse ajuste, fez-se a seleção da cabeça dos

espermatozoides, copiando-a e levando-a a uma segunda janela em branco, na qual a imagem foi reajustada. Nesse espaço, utilizando a ferramenta *Wand (tracing) tool*, a delimitação do contorno da cabeça da célula espermática foi realizada, o que permitiu as mensurações.

Os parâmetros de morfometria da cabeça dos espermatozoides analisados foram área (dada em pixels quadrados), centroide (média das coordenadas X e Y de todos os pixels da cabeça dos espermatozoides), centro de massa (média ponderada das coordenadas X e Y de todos os pixels da imagem selecionada, sendo XM e YM), perímetro (comprimento da fronteira externa da cabeça dos espermatozoides), retângulo (traça-se o menor retângulo envolvendo a imagem selecionada, usa-se BX e BY, largura e altura, respectivamente, sendo estas as coordenadas do canto superior esquerdo do retângulo), eixos da elipse (maior e menor, sendo os principais eixos da elipse traçada na cabeça dos espermatozoides), largura e comprimento.

2.1.4. Determinação das subpopulações

As subpopulações espermáticas foram definidas por análise multivariada de agrupamento hierárquico e não-hierárquico, de modo que as partidas foram avaliadas isoladas e conjuntamente. Análise de cluster multivariada *K-means* foi realizada para classificar os espermatozoides em um número reduzido de subpopulações de acordo com sua morfometria de cabeça, após a análise de agrupamento de Ward, utilizando distância Euclideana. Células espermáticas com morfometria próximas foram atribuídas ao mesmo grupo, enquanto os demais espermatozoides foram colocados em grupamentos diferentes, de modo que os centros de cada grupamento correspondem às médias das observações atribuídas a cada grupo. O número específico de subpopulações com base na

análise prévia de dendogramas hierárquicos foi calculado por nível de distância e similaridade entre os agrupamentos.

2.2. Experimento 2: Fertilização *in vitro*

2.2.1 Delineamento experimental

Oócitos de vacas oriundos de abatedouro foram maturados *in vitro* e fertilizados aleatoriamente com sêmen de oito touros do experimento 1. No total, três réplicas por animal foram realizadas (N=24). Após 20 horas de incubação, os possíveis zigotos foram fixados e o número de pronúcleos formados foi determinado a fim de avaliar a taxa de fertilidade da partida de sêmen.

2.2.2 Coleta de óocitos bovinos e maturação *in vitro*

Ovários bovinos foram adquiridos a partir de abatedouro local e transportados imediatamente em solução salina 0,9% (NaCl) com 100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina G, à temperatura de 37°C. Complexos *cúmulo-oócitos* (CCOs) foram adquiridos por aspiração de folículos de 3 a 8 mm com auxílio de seringa de 5 mL e agulha 18 gauge e depositados em tubos plásticos de 50 mL para sedimentação. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o precipitado vertido em placa de cultivo celular 100 x 200 mm contendo meio TALP-HEPES para avaliação dos CCOs em estereomicroscópio. Apenas CCOs com três ou mais camadas de células do *cumulus* com citoplasma homogêneo foram selecionados para maturação *in vitro*. Grupos de 25 a 30 CCOs foram colocados em 400 µL de meio de maturação *in vitro* (MIV), composto por *Tissue Culture Medium* 199 (TCM 199) com sais de Earle, L-glutamina e 2,2 g/L de bicarbonato de sódio acrescido de 10 % de soro de vaca em cio (SVC), 20 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 49,4 µg/mL de Piruvato de

sódio (0,45 mM), 100 UI/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina, em placas de quatro poços e cultivados durante 22-24 horas a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂.

2.2.3 Preparação do sêmen e fertilização *in vitro*

Após a maturação, os CCOs foram lavados em PBS e transferidos ao acaso em gotas de 70 µL de meio de fertilização (FERT-TALP, acrescido de heparina; 10 UI/mL). Uma palheta de sêmen da mesma partida que a utilizada para determinação das subpopulações, referente a cada animal, foi utilizada para FIV. As palhetas foram descongeladas à 37°C durante 30 segundos e o sêmen imediatamente avaliado em relação à motilidade e vigor em microscopia óptica convencional. 250 µL de sêmen foram adicionados em solução Percoll (45% e 90%, 200µL cada) e centrifugados (Sorvall Pico) durante 7 minutos a 8000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido, o sedimento ressuspense em 400 µL de meio FERT-TALP e centrifugado novamente durante 5 minutos a 3200 rpm. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspense em 70 µL de meio FERT-TALP. Uma nova avaliação da motilidade e vigor foi realizada em microscopia convencional. Os espermatozoides foram contados em câmara de Neubauer e diluídos em meio de fertilização para concentração final de 2×10^6 espermatozoides/mL. Uma alíquota da suspensão do sêmen foi adicionada a cada gota de fertilização, totalizando 100 µL. As placas foram incubadas por um período de 20 horas a 38,5°C em estufa com 5% de CO₂.

2.2.4 Avaliação da taxa de penetração e número de prónucleos

Os possíveis zigotos foram adicionados 20 horas após a inseminação à 1 mL de TALP e submetidos ao vortex por 5 minutos para remoção das células do *cumulus*. Posteriormente foram lavados em solução salina tamponada (PBS)

com álcool polivinílico (PVA; 1mg/mL) e fixados por 30 minutos em paraformaldeído a 4% (vol/vol) em PBS e lavados novamente em PBS com PVA. A coloração foi feita com Hoechst 33342 (5 µg/mL) e colocado sob lâmina de vidro. A taxa de formação de pronúcleos e o número de pronúcleos foram avaliados em aumento de 400x em microscopia de epifluorescência (Motic BA400, excitação de 330-385nm e emissão de 420-490nm).

2.3. Análise estatística

Os dados foram previamente padronizados por possuírem métricas em diferentes escalas. Uma única célula foi considerada *outlier* pelo teste de Grubbs. A normalidade dos resíduos foi testada por Shapiro-Wilk. Os parâmetros fornecidos pelo *Image J* foram submetidos à análise de variância de grupo (VGA) e análise de correlação de Pearson, com nível de significância $P=0,05$ para diminuir o número de variáveis trabalhadas e possível redundância entre elas.

Na construção dos grupamentos, métodos hierárquicos e particionais (não-hierárquicos) foram utilizados em 1799 espermatozoides pertencentes às nove partidas de sêmen avaliadas conjuntamente e em 200 espermatozoides, quando avaliadas isoladamente. Para criar uma hierarquia alinhada de aglomerados e posterior confecção de um dendograma foi realizada a análise multivariada de grupamento hierárquico de Ward, utilizando distância Euclidiana. O número ótimo de subpopulações foi determinado a partir da análise de comportamento do nível de similaridade e distância nos vários passos do grupamento. À medida que se avança nos vários passos do agrupamento, a similaridade entre os conglomerados decresce e a distância aumenta. Variações acentuadas dessas medidas, representadas por um “ponto de salto”, indicam potencialmente números ideais de *clusters*. Após a definição do número de

grupos, foi realizada pelo método *K-means* a análise multivariada não-hierárquica, cuja função foi buscar a partição ótima dos dados, o que permite determinar a proporção de células pertencentes a cada subpopulação. A validação dos grupamentos para verificação da diferença entre as médias de cada subpopulação foi feita pelo teste de Tukey.

Cada partida de sêmen foi considerado uma observação independente. Taxa de formação de pronúcleos e proporções de células nas subpopulações foram testadas para normalidade, homocedastidade e independência, pelos testes de Shapiro-Wilk, Bartlett e Box-Pierce, respectivamente. Finalmente, análise de regressão foi utilizada para explorar a relação entre a proporção de cada uma das subpopulações encontradas nas amostras de sêmen e fertilidade *in vitro*, sendo taxa de formação de pronúcleos a variável dependente e a proporção de SP a variável independente. O procedimento utilizado foi previamente descrito [9] e consiste na otimização da equação de regressão ($y = a + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k$) para aumentar o coeficiente de determinação (R^2). Duas partidas foram retiradas da análise estatística, sendo uma por não apresentar diferença significativa para área, com proporção de SP4 não definida e outra por ser considerada *outlier* na análise dos resíduos, apresentando taxa de fertilidade superior às demais.

Toda análise estatística das subpopulações foi realizada nos programas Minitab 17.1.0, enquanto o R versão 3.3.1, pacote *MVar.pt* versão 1.9.4 foi utilizado para análise de regressão e análise dos resíduos. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

3. Resultados

3.1 Experimento 1: Identificação de subpopulações espermáticas morfometricamente distintas em sêmen congelado bovino de *Bos taurus indicus*

Os valores dos parâmetros fornecidos pelo CASA estão demonstrados na tabela 2. Com a exceção das partidas referentes aos animais 6 e 8, todas as demais apresentaram motilidade total pós-descongelação acima de 30%.

Após a padronização dos dados, as variáveis área, comprimento, centro de massa (XM e YM) e largura, foram determinadas pela análise de variância de grupo (VGA) (Fig. 1). Dentre as variáveis previamente selecionadas, apenas área, centro de massa e largura foram definidas para confecção dos agrupamentos, por apresentarem menores valores de correlação ($r < 0,03$; $P < 0,05$). Comprimento foi excluído por apresentar alta correlação negativa com largura ($r = -0,639$; Tabela 3).

Quatro diferentes subpopulações espermáticas (SP) foram determinadas em sêmen congelado de *Bos taurus indicus*, por haver maior diferença no índice criado por agrupamento de similaridade e distância entre 1794 e 1795, o que determina o número ótimo de quatro subpopulações (Tabela 4).

As quatro subpopulações encontradas diferiram principalmente em relação à área da cabeça dos espermatozoides ($P < 0,05$). A subpopulação 1 (SP1) foi composta pelos espermatozoides de menor área ($\bar{X} = 966 \pm 66,8 \text{pix}^2$), com 21,3% do total de células, SP2 ($\bar{X} = 981,84 \pm 69,27 \text{pix}^2$) e SP3 ($\bar{X} = 1007,99 \pm 82,91 \text{pix}^2$) por espermatozoides de área de cabeça intermediária, com 17,5 e 18,5% do total de células, respectivamente, e SP4, subpopulação majoritária com 42,7% composta pelos espermatozoides de maior área de cabeça ($\bar{X} = 1075,51 \pm 49,03 \text{pix}^2$; Tabela 5).

3.2 Experimento 2: Relação entre as subpopulações e fertilização *in vitro*

A taxa de fertilidade média das oito partidas de sêmen submetidos à fertilização *in vitro* variou de 54,4% a 69,1% (Tabela 6).

Correlação negativa ($r = -0,91$; $P < 0,05$) foi observada entre o número relativo de células em SP4 (%) e taxa de formação de pronúcleos. A relevância da proporção de células em SP4 em prever a fertilidade foi confirmada pela análise de regressão linear como na equação de regressão que inclui % SP4 como variável independente. Além disso, a equação apresentou alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,83$ e R^2 ajustado = $0,79$) e o modelo foi considerado significativo ($P < 0,05$; Tabela 7).

4. Discussão

No presente trabalho, observou-se a presença de quatro subpopulações espermáticas definidas por diferentes parâmetros de morfometria da cabeça dos espermatozoides de *Bos taurus indicus*. Amostras de sêmen são heterogêneas, o que implica em espermatozoides apresentando morfologia e motilidade diferentes no mesmo ejaculado [1,2,13]. Dessa forma, nas diferentes espécies animais, três a quatro subpopulações espermáticas já foram descritas [13]. Na espécie bovina, quatro diferentes subpopulações foram identificadas por parâmetros cinéticos [7–9], enquanto por parâmetros de morfometria da cabeça dos espermatozoides, de três a quatro subpopulações já foram encontradas [6,14]. Porém, os trabalhos publicados foram em *Bos taurus taurus*, e não há trabalho em *Bos taurus indicus*.

Diferenças na morfologia espermática já foram encontradas entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, de modo que medidas relacionadas ao tamanho da cabeça dos espermatozoides, como área, perímetro, largura e comprimento são menores em *Bos taurus indicus* [15]. Dessa forma, tendo em vista as diferenças já descritas [6,14,15] e os resultados aqui encontrados (4 subpopulações), é possível que o número de subpopulações por parâmetros de

morfometria de cabeça dos espermatozoides varie de três à quatro entre as subespécies bovinas.

A fertilidade do sêmen é complexa e envolve uma série de fatores, o que depende da interação da população heterogênea de espermatozoides com o trato reprodutivo da fêmea e com o oócito [16]. Para avaliação da fertilidade das partidas de sêmen pós-criopreservação, além das técnicas convencionais de laboratório, a fertilização *in vitro* e o ensaio de penetração espermática tem sido usados como indicador da capacidade de fertilização dos espermatozoides [9,17]. Como as diferenças nas proporções relativas de células nas subpopulações podem identificar alterações fisiológicas do sêmen [13], é possível que diferenças nas taxas de fertilidade também possam ser explicadas pela heterogeneidade do sêmen [9,18,19]. No entanto, pouca informação está disponível em relação à correlação das subpopulações de espermatozoides com qualidade do ejaculado e capacidade fertilizante em touros [9].

A incubação de espermatozoides pertencentes a ejaculados com diferentes proporções de células de maior área de cabeça (SP4), juntamente com oócitos bovinos maturados indicou que a maior proporção relativa de SP4 interfere negativamente na fertilização *in vitro*. O modelo de regressão linear demonstrou que à medida que a proporção relativa de células em SP4 aumenta, a taxa de formação de pronúcleos diminui.

Há evidências que a morfologia espermática esteja relacionada à aptidão reprodutiva masculina. Em espécies de fecundação externa e nas quais ocorre competição espermática, espermatozoides com maior comprimento de cabeça apresentaram maior velocidade de deslocamento e conseqüentemente maiores taxas de fertilização [20–23]. Em mamíferos, a relação da morfometria da cabeça dos espermatozoides com a fertilidade parece não estar completamente elucidada. Em bovinos, não houve diferença entre a média de variáveis morfométricas mensuradas (comprimento, largura, comprimento/largura, área e

perímetro) pós-descongelamento e taxa de não retorno ao cio [24]. No entanto, trabalhou-se com valores médios e a heterogeneidade do sêmen não foi levada em consideração. Em carneiros com melhores taxas de fertilidade a campo observou-se maiores proporções de subpopulações compostas por células largas e longas [19], assim como correlação negativa ($r = -0,75$; $P < 0,05$) foi encontrada entre fertilidade e porcentagem de espermatozoides com cabeça curta e larga [25]. Por outro lado, ainda em ovinos, diferenças nas taxas de fertilidade parecem estar fortemente associadas ($P < 0,01$) à proporção de espermatozoides curtos e alongados [26], semelhantemente ao encontrado em cervídeos ($R^2 = 0,67$) [18] e no presente estudo.

Para cumprir suas funções, os espermatozoides possuem arquitetura especializada, que incluem mudanças drásticas na cromatina espermática pela substituição de 90-95% das histonas por protaminas. A protaminação facilita a compactação nuclear necessária para motilidade, assim como fornece proteção ao genoma [27–29]. Como a cabeça do espermatozoide é formada basicamente por núcleo, o grau de compactação da cromatina pode refletir na morfometria do espermatozoide. Dessa forma, espermatozoides bovinos com anormalidades na cromatina apresentaram alterações morfométricas, que incluem maior área de cabeça [30]. Além disso, a compactação inadequada parece refletir na fertilidade, já que touros com grau de protaminação deficiente e fragmentação de DNA aumentada apresentaram fertilidade reduzida [28]. Dessa forma, é possível que a menor taxa de fertilização *in vitro* encontrada em ejaculados com maior proporção de células com maior área de cabeça seja consequência de uma protaminação inadequada, resultando em menor compactação nuclear e consequente falha no momento da fertilização.

5. Conclusão

Em conclusão, sêmen pós-criopreservação de touros *Bos taurus indicus* apresenta quatro subpopulações espermáticas definidas por parâmetros de morfometria de cabeça de espermatozoides. Além disso, a maior proporção relativa de células de maior área de cabeça apresenta correlação negativa com a fertilidade *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- [1] Rodríguez-Martínez H. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:91–101. doi:10.1071/RD06104.
- [2] Ramón M, Jiménez-Rabadón P, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Soler AJ, Fernández-Santos MR, et al. Understanding sperm heterogeneity: Biological and practical implications. *Reprod Domest Anim* 2014;49:30–6. doi:10.1111/rda.12404.
- [3] Thurston LM, Watson PF, Mileham a J, Holt W V. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl* 2001;22:382–94.
- [4] Quintero-Moreno A, Miró J, Teresa Rigau A, Rodríguez-Gil JE. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 2003;59:1973–90. doi:10.1016/S0093-691X(02)01297-9.
- [5] Maroto-Morales A, Ramón M, García-Álvarez O, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Roldan ERS, et al. Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in Ram ejaculates: Intra- and interindividual variation. *Theriogenology* 2012;77:1529–39. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.11.020.
- [6] Rubio-Guillén J, González D, Garde JJ, Esteso MC, Fernández-Santos MR, Rodríguez-Gil JE, et al. Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod Domest Anim* 2007;42:354–7. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00788.x.
- [7] Muiño R, Tamargo C, Hidalgo CO, Peña AI. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Anim Reprod Sci* 2008;109:27–39. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.10.007.
- [8] Muiño R, Peña AI, Rodríguez A, Tamargo C, Hidalgo CO. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology* 2009;72:860–8. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.06.009.

- [9] Ferraz MAMM, Morató R, Yeste M, Arcarons N, Pena AI, Tamargo C, et al. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to invitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology* 2014;81:1067–72. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.01.033.
- [10] García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Martínez-Pastor F, Garde JJ, Ramón M, Fernández-Santos MR, et al. Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: Electroejaculation and postmortem collection. *Theriogenology* 2009;72:160–8. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.02.002.
- [11] Macedo MC, Lucia T, Rambo G, Ferreira Filho EB, Rosa AP, Fabiane C, et al. In vitro penetration of swine oocytes by homologous spermatozoa: Distinct systems for gamete's co-incubation and oocyte's cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 2010;117:295–301. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.05.013.
- [12] Taberner E, Morató R, Mogas T, Miró J. Ability of Catalanian donkey sperm to penetrate zona pellucida-free bovine oocytes matured in vitro. *Anim Reprod Sci* 2010;118:354–61. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.08.005.
- [13] Martínez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L, de Paz P. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology* 2011;75:783–95. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.11.034.
- [14] Valverde A, Arenán H, Sancho M, Contell J, Yániz J, Fernández A, et al. Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws. *Asian J Androl* 2016;0:0. doi:10.4103/1008-682X.187579.
- [15] Em M, Costa F. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil 2005;85:105–16. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.019.
- [16] Rodríguez-Martínez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: Still Utopia? *Reprod Domest Anim* 2003;38:312–8. doi:10.1046/j.1439-0531.2003.00436.x.
- [17] Park Y-J, Mohamed E-S a., Oh S-A, Yoon S-J, Kwon W-S, Kim H-R, et al. Sperm Penetration Assay as an Indicator of Bull Fertility. *J Reprod Dev* 2012;58:461–6. doi:10.1262/jrd.11-067H.

- [18] Ramón M, Soler AJ, Ortiz JA, García-Alvarez O, Maroto-Morales A, Roldan ERS, et al. Sperm Population Structure and Male Fertility: An Intraspecific Study of Sperm Design and Velocity in Red Deer. *Biol Reprod* 2013;89:1–7. doi:10.1095/biolreprod.113.112110.
- [19] Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Sánchez-Nadal J a., Santolaria P. Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Anim Reprod Sci* 2015;156:128–34. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.03.012.
- [20] Bennison C, Hemmings N, Slate J, Birkhead T, Bennison C. Long sperm fertilize more eggs in a bird. *Proc R Soc B* 2015;282:20141897. doi:10.1098/rspb.2014.1897.
- [21] Simpson JL, Humphries S, Evans JP, Simmons LW, Fitzpatrick JL. Relationships between sperm length and speed differ among three internally and three externally fertilizing species. *Evolution (N Y)* 2014;68:92–104. doi:10.1111/evo.12199.
- [22] Tourmente M, Gomendio M, Roldan ERS. Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evol Biol* 2011;11:12. doi:10.1186/1471-2148-11-12.
- [23] Maroto-Morales A, García-Álvarez O, Ramón M, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, Soler AJ, et al. Current status and potential of morphometric sperm analysis. *Asian J Androl* 2016;0:0. doi:10.4103/1008-682X.187581.
- [24] Gravance CG, Casey ME, Casey PJ. Pre-freeze bull sperm head morphometry related to post-thaw fertility. *Anim Reprod Sci* 2009;114:81–8. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.09.014.
- [25] Martínez-Rodríguez C, Alvarez M, López-Urueña E, Gomes-Alves S, Anel-López L, Tizado JE, et al. Head morphology of ram spermatozoa is associated with their ability to migrate in vitro and correlates with fertility. *Reprod Fertil Dev* 2015. doi:10.1071/RD15022.
- [26] Maroto-Morales A, Ramón M, García-Álvarez O, Montoro V, Soler AJ, Fernández-Santos MR, et al. Sperm head phenotype and male fertility in ram semen. *Theriogenology* 2015;84:1536–41. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.038.
- [27] Hammoud S, Liu L, Carrell DT. Protamine ratio and the level of histone retention in sperm selected from a density gradient preparation 2009:88–94.

- [28] Dogan S, Vargovic P, Oliveira R, Belser LE, Kaya A, Moura A, et al. Sperm protamine-status correlates to the fertility of breeding bulls. *Biol Reprod* 2015;92:92. doi:10.1095/biolreprod.114.124255.
- [29] Carrell DT. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril* 2012;97:267–74. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.12.036.
- [30] Kipper BH, Trevizan JT, Carreira JT, Carvalho IR, Mingoti GZ, Beletti ME, et al. Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on in vitro fertilization. *Theriogenology* 2016. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.08.017.

Tabela 1

Configuração experimental para uso do equipamento Hamilton Thorne Biosciences (Ultimate Sperm Analyzer)

Característica	Ajuste
Número de imagens adquiridas	30
Taxa de aquisição das imagens	60 Hz
Contraste mínimo das células	50
Tamanho mínimo das células	6 pixels
Contraste para células imóveis	30
Retilinearidade (STR), Limiar	60%
Valor de corte de VAP para células lentas	30,0 $\mu\text{m/s}$
VAP mínimo para células progressivas	40,0 $\mu\text{m/s}$
Valor de corte de VSL para células lentas	20,0 $\mu\text{m/s}$
Intensidade da célula	80
Tamanho da cabeça estática	0,23 a 1,91
Intensidade da cabeça estática	0,56 a 1,20
Alongamento estático	8 a 92
Aumento	1,89

Abreviações: VAP, velocidade de trajeto; VSL, velocidade retilínea

Tabela 2

Valores médios dos parâmetros fornecidos pela Análise Computadorizada de sêmen (CASA) para todas as partidas de sêmen criopreservado de diferentes animais, oriundas de centrais de coleta e processamento de sêmen.

Touro	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	LIN (%)
1	47	25	76,6	59,5	139,6	6,9	30,3	45
2	48	21	66,7	49,4	126,3	6,5	29,9	42
3	44	19	93,6	62,5	180,6	8,3	28,0	36
4	69	35	88,2	62,6	163,7	7,7	29,4	40
5	39	17	91,9	63,2	176,4	8,3	27,7	37
6	25	13	77,6	61,8	137,6	7,1	29,8	46
7	61	29	69,5	52,7	128,0	6,7	32,2	43
8	28	16	80,6	63,8	145,2	6,6	28,2	45
9	49	27	76,3	57,0	145,0	7,1	27,2	41

Abreviações: MT, motilidade total; MP, motilidade progressiva; VAP, velocidade de trajeto; VSL, velocidade retilínea; VCL, velocidade curvilínea; ALH, amplitude lateral da cabeça; BCF, frequência de batimentos; LIN, linearidade

Tabela 3

Análise de correlação de Pearson entre as variáveis utilizadas para definição das subpopulações espermáticas, observadas em partidas de sêmen de touros da raça Nelore, oriundas de centrais de coleta e processamento de sêmen.

	Área	XM	YM	Largura
XM	0,077*			
YM	0,018 P=0,446	0,020 P=0,406		
Largura	0,265*	0,088*	0,026*	
Comprimento	0,106*	-0,029 P=0,22	-0,007 P=0,766	-0,639*

Abreviações: XM e YM, centro de massa

*P<0,05

Tabela 4

Similaridade e distâncias entre os agrupamentos (subpopulações espermáticas) formados no agrupamento hierárquico de Ward, utilizando distância Euclideana.

Passos	Nº Agrupamentos	Similaridade	Distância
1	1798	99,98	0,00
2	1797	99,93	0,02
:	:	:	:
1789	10	-119,84	68,76
1790	9	-158,42	80,82
1791	8	-228,17	102,64
1792	7	-290,68	122,19
1793	6	-370,43	147,13
1794	5	-381,34	150,55
1795	4	-698,88	249,86
1796	3	-807,19	283,73
1797	2	-951,24	328,79
1798	1	-1.112,10	379,10

Tabela 5

Proporção de espermatozoides e médias descritivas das variáveis dentro de cada subpopulação, avaliando todas as partidas conjuntamente (pixels).

Subpopulações	Proporção (%)	Área	XM	YM	Largura
SP1	21,3 (383/1799)	966,0 (959,29 - 972,71) ^d	175.504,0 (169.178,91 - 181.829,07) ^c	264.935,0 (260.040,89 - 269.829,11) ^a	36,2 (35,34 - 37,06) ^c
SP2	17,5 (316/1799)	981,9 (974,28 - 989,61) ^c	168.653,6 (160.570,76 - 176.736,50) ^c	111.989,0 (107.000,90 - 116.977,08) ^c	35,3 (34,32 - 36,21) ^c
SP3	18,5 (332/1799)	1008,0 (999,04 - 1016,94) ^b	304.894,7 (300.551,84 - 309.237,50) ^a	192.908,2 (186.705,23 - 199.111,11) ^b	48,1 (46,33 - 49,79) ^a
SP4	42,7 (768/1799)	1075,5 (1072,03 - 1078,98) ^a	186.735,6 (183.550,39 - 189.920,88) ^b	200.425,2 (198.566,43 - 202.283,90) ^b	44,3 (43,73 - 44,77) ^b

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Abreviações: SP1, subpopulação 1; SP2, subpopulação 2; SP3, subpopulação 3; SP4, subpopulação 4; XM e YM, centro de massa.

Tabela 6

Efeito de diferentes proporções de espermatozoides com maior área de cabeça (SP4) na interação espermatozoide-oócito, usando sêmen congelado de touros da raça Nelore e oócitos bovinos maturados *in vitro*

Número do touro	Repetição	Proporção de spz em SP4 (%)	Número de oócitos	TFP (%)	Média TFP (%)
1	1	-	27	82,35	69,09
1	2	-	24	57,89	
1	3	-	26	68,42	
2	1	16,0	32	62,5	64,71
2	2	16,0	30	66,67	
2	3	16,0	25	64,71	
3	1	30,5	19	68,75	61,54
3	2	30,5	29	61,54	
3	3	30,5	29	56,52	
4	1	47,5	23	52,63	54,39
4	2	47,5	28	55,00	
4	3	47,5	24	55,56	
5	1	33,0	29	64,29	60,87
5	2	33,0	27	50,00	
5	3	33,0	21	73,33	
6	1	33,7	20	72,22	68,52
6	2	33,7	17	53,85	
6	3	33,7	28	73,91	
7	1	37,5	32	58,62	61,54

7	2	37,5	21	68,75	
7	3	37,5	28	60,00	
8	1	40,5	19	76,92	56,90
8	2	40,5	29	45,00	
8	3	40,5	35	56,00	

Abreviações: Sptz, espermatozoide; SP4, subpopulação 4; TFP, taxa de formação de pronúcleos

Tabela 7

Equação de regressão, R^2 , r , F e valor de P para Taxa de Formação de Pronúcleos

Parâmetro	Equação de Regressão	R^2	r	F	Valor de P
	$TFP = 70,79996 -$				
TFP	$0,31634SP4$	0,8351	-0,9138	20,252	0,0108

Abreviações: TFP, taxa de formação de pronúcleos

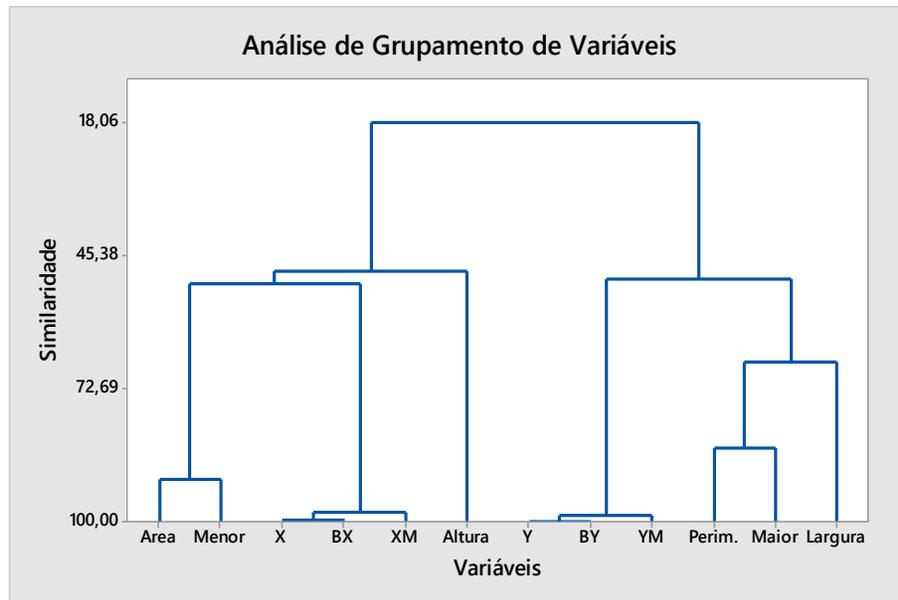


Figura 1: Análise de Grupamento de Variáveis realizada a fim de evitar redundância entre as informações fornecidas.

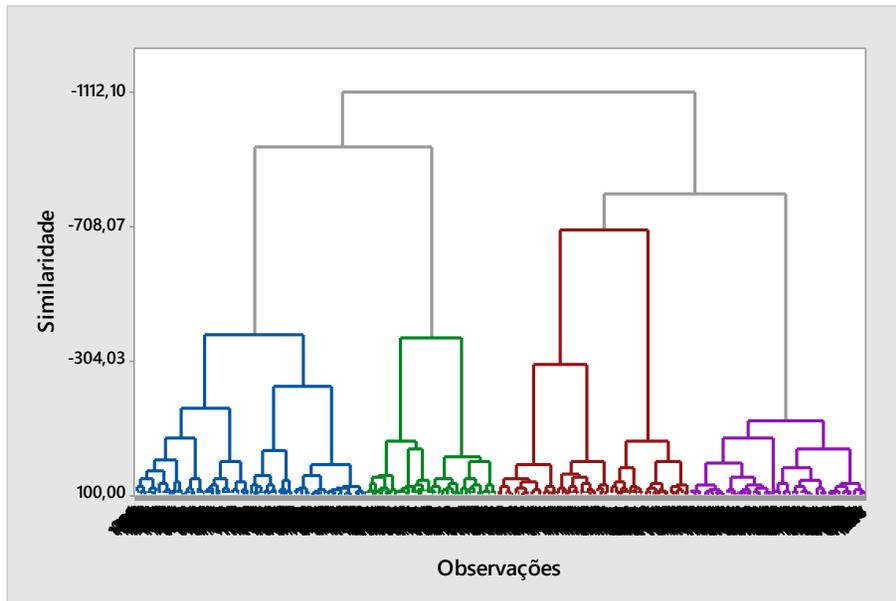


Figura 2: Dendrograma dos dados - Agrupamento hierárquico de Ward com distância Euclidiana.