



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANNE KEMMER SOUZA

**EFEITO DA REFRIGERAÇÃO SOBRE A QUALIDADE E AS
SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS DE FELINOS
DOMÉSTICOS**

Londrina
2017

ANNE KEMMER SOUZA

**EFEITO DA REFRIGERAÇÃO SOBRE A QUALIDADE E AS
SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS DE FELINOS DOMÉSTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre.
Orientador(a): Prof^a Dr^a Maria Isabel Mello Martins

Londrina
2017

ANNE KEMMER SOUZA

**EFEITO DA REFRIGERAÇÃO SOBRE A QUALIDADE E AS
SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS DE FELINOS DOMÉSTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Isabel Mello Martins
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Fabiana Ferreira de Souza
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita
Filho” - UNESP

Prof^a Dr^a Lúcia Daniel Machado da Silva
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Londrina, 17 de fevereiro de 2017.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Souza, Anne Kemmer Souza.

Efeito da refrigeração sobre a qualidade e as subpopulações espermáticas de felinos domésticos / Anne Kemmer Souza Souza. - Londrina, 2017.
93 f. : il.

Orientador: Maria Isabel Mello Martins Martins.

Coorientador: Fabiana Ferreira de Souza Souza.

Coorientador: Lúcia Daniel Machado da Silva Machado.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Reprodução animal - Tese. 2. Sêmen - Criopreservação - Tese. 3. Espermatozóides - Avaliação - Tese. 4. Gato - Espermatozóides - Tese. I. Martins, Maria Isabel Mello Martins. II. Souza, Fabiana Ferreira de Souza. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, por ser soberano em cada detalhe da minha vida. Por sua graça e misericórdia que me acompanham todos os dias e me levaram a concluir mais essa etapa profissional, acrescentando experiências e lições fundamentais para continuar caminhando.

Aos meus pais José de Souza Neto e Rosmeiry Kemmer Souza, e também meu irmão Rudolfo Kemmer Souza, que com um carinho imensurável me apoiaram, sofreram e lutaram ao meu lado em cada momento, sempre presentes. Obrigada por se interessarem tanto por este trabalho. Dedico essa vitória à vocês.

Agradeço ao meu companheiro de todas as horas, Luís Otávio Candotti, que durante o mestrado se tornou meu marido, e que dia a dia vêm me suprimo e cuidando com amor, sempre acreditando e tornando todo sonho possível. Sou grata por estar presente em cada fase desse trabalho, seja para buscar os gatos, limpar as baias, ficar até de noite me esperando processar as análises só para eu não ficar sozinha no laboratório, assim como pela paciência infinita demonstrada no momento da escrita, onde abriu mão da minha companhia e atenção por saber o quão importante era para mim a conclusão do mestrado. Espero um dia conseguir retribuir tudo o que fez por mim.

Agradeço a minha orientadora Maria Isabel Mello Martins, não só pela confiança, credibilidade e paciência, mas também pelas constantes orientações.

Aos professores Marcelo Marcondes Seneda, Guilherme Schiess e Fabiana Ferreira de Souza, por todo desenvolvimento da dissertação, correção e também por seus conselhos e estímulo.

Ao professores Thales Ricardo Rigo Barreiros, Fábio Morotti e Lúcia Daniel Machado da Silva por aceitarem fazer parte da banca com sugestões e correções, agregando conhecimento e experiência ao trabalho.

Gostaria de agradecer em especial aos amigos Cristiane Sella Paranzini e Luiz Guilherme Trautwein pelo auxílio técnico no experimento, pelo conhecimento acadêmico nas idéias, pela elaboração de parte da estatística, pelo incentivo emocional e principalmente pela paciência demonstrada em toda essa fase. Sem vocês esse trabalho não aconteceria.

Ao grupo de pesquisa ANESTAC, que me ajudaram a tornar essa pesquisa possível.

A toda equipe do laboratório de Reprodução da Universidade Estadual de Londrina (REPROA), em especial as amigas que nasceram no mestrado e continuaram por toda vida Camila Bortoliero, Camila Bizarro e Larissa Bergamo, minha gratidão por serem tão presente nesses dois anos e me suportarem todos os dias com muita cumplicidade e parceria.

Ao doutor Fábio Monteiro por ceder o *software* necessário para avaliação individuais das células no Instituto de Zootecnia em Sertãozinho/SP e ao estatístico Gleyson pelo conhecimento na área e ajuda na etapa final do experimento. Este trabalho só teve prosseguimento nos momentos de desafios graças ao profissionalismos de vocês, obrigada.

Aos responsáveis pela ONGs, proprietário, cuidadores por cederem os animais para o experimento, principalmente a Fabiana Doring pelos contatos, logística e transporte dos gatos quando necessário.

À Capes pela concessão da bolsa e ao programa de Pós Graduação em Ciência Animal, especialmente a professora Dra. Ana Paula Bracarense e a Helenice, pela dedicação ao programa, e pelo auxílio nas horas de dificuldades, tanto financeiras quanto burocráticas.

Souza, Anne Kemmer. **Efeito da refrigeração sobre a qualidade e as subpopulações espermáticas de felinos domésticos**. 2017. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo identificar as subpopulações espermáticas de felinos domésticos colhidos por eletroejaculação (EEJ) e recuperação da cauda do epidídimo (EPD). Avaliar o efeito da refrigeração na distribuição de frequência de espermatozoides nas diferentes subpopulações. As amostras espermáticas foram colhidas de 29 felinos adultos, SRD, semi-domiciliados, por EEJ e/ou EPD, e após as análises de motilidade, concentração, morfologia e da cinética espermática pelo sistema CASA (HTR-IVOS, version 14.0), foram centrifugadas e diluídas em meio ACP – 117®, aliquotadas e refrigeradas a -1°C ou 4°C por até 48 horas. Posteriormente, as análises iniciais foram repetidas e a leitura das subpopulações foi realizada pelo *software* EDITY/SORT. Após a tabulação dos dados e análise estatística multivariada foram elaborados dois artigos. O artigo I avaliou a qualidade espermática de felinos domésticos, obtidos por EEJ e EPD, e após a refrigeração a -1°C por 24 e 48 horas em 29 animais. O artigo II identificou e comparou as subpopulações espermáticas de gatos domésticos colhidos por EEJ, refrigerados a -1°C por 24 e 48 horas, e adicionalmente analisou a frequência de espermatozoides nas subpopulações determinadas em 10 gatos adultos. No artigo I, no EEJ foi observado valores superiores de total de defeitos morfológicos após 24 e 48 horas de refrigeração a 4°C ($p < 0,022$) em comparação com a refrigeração a -1°C. No EPD foi detectada maior redução da qualidade espermática após 24 horas de refrigeração a 4°C, tanto na motilidade como cinética espermática e índices de movimento e velocidade quando comparada à refrigeração a -1°C. No artigo II, a análise dos componentes principais (CP) identificou a existência de três grupos com maior iteração nos três momentos: CP1 (VAP, VCL, VSL, ALH, SVI), CP2 (STR, LIN, WOB e SMI) e o CP3 (BCF). A subpopulação 1 após 48 horas de refrigeração a -1°C, e a subpopulação 3 após 24 horas de refrigeração a 4°C mantiveram a qualidade espermática, podendo caracterizar grupos de espermatozoides resistentes à criopreservação. Os valores da distribuição das proporções dos espermatozoides em cada subpopulação se mostraram similares entre os grupos. Após a realização deste estudo foi possível concluir que a refrigeração a -1°C de espermatozoides felinos por até 48 horas foi eficiente para manter a qualidade espermática colhida por EEJ e pela EPD, podendo ser uma nova alternativa à criopreservação espermática de felinos domésticos. O presente estudo identificou três subpopulações espermáticas bem definidas no ejaculado de gatos, com distribuições proporcionais entre os grupos. Foram identificadas duas subpopulações mais resistentes à refrigeração espermática. Como aplicação prática do estudo das subpopulações podem ser identificados indivíduos mais resistentes à criopreservação do sêmen, com maior longevidade e com características desejáveis à FIV.

Palavras-chave: Movimento Espermático. Temperatura de Refrigeração. Gatos. Estatística Multivariada. Análise Computadorizada.

Souza, Anne Kemmer. **Effect of refrigeration on sperm quality and subpopulations of domestic felines**. 2017. 96p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The present work aims to identify the sperm subpopulations of domestic felines collected by electroejaculation (EEJ) and epididymal tail recovery (EPD) and evaluate the effect of refrigeration on the distribution of sperm frequency in different subpopulations. The sperm samples were collected from 29 adult cats, SRD, semi-domed, by EEJ and / or EPD, and after analysis of motility, concentration, morphology and spermatoc kinetics by the CASA system (HTR-IVOS, version 14.0) were centrifuged and diluted in ACP-117® extender, aliquoted and refrigerated at -1 ° C or 4 ° C for up to 48 hours. Subsequently, the initial analyzes were repeated and the reading of the subpopulations was performed by EDITY / SORT software. After data tabulation and multivariate statistical analysis, two articles were elaborated. Article I evaluated the sperm quality of domestic cats, obtained by EEJ and EPD, and after cooling at -1 ° C for 24 and 48 hours in 29 animals. Article II identified and compared the sperm subpopulations of domestic cats harvested by EEJ, chilled at -1 ° C for 24 and 48 hours, and further analyzed the frequency of spermatozoa in subpopulations determined in 10 adult cats. In article I, in the EEJ, higher values of total morphological defects were observed after 24 and 48 hours of refrigeration at 4 ° C ($p < 0.022$) compared to refrigeration at -1 ° C. In the EPD, a greater reduction in sperm quality was detected after 24 hours of refrigeration at 4 ° C, both in motility and sperm kinetics and in movement and speed indexes when compared to refrigeration at -1 ° C. The main components (CP) identified three groups with the highest iteration in the three moments: CP1 (VAP, VCL, VSL, ALH, SVI), CP2 (STR, LIN, WOB and SMI) and CP3 (BCF). Subpopulation 1 after 48 hours of refrigeration at -1 ° C and subpopulation 3 after 24 hours of refrigeration at 4 ° C maintained the sperm quality, being able to characterize groups of spermatozoa resistant to cryopreservation. The values of the distribution of sperm proportions in each subpopulation were similar between the groups. After this study, it was possible to conclude that the cooling at -1 ° C of feline spermatozoa for up to 48 hours was efficient to maintain the spermatoc quality collected by EEJ and EPD, and could be a new alternative to the sperm cryopreservation of domestic felines. The present study identified three well-defined spermatoc subpopulations in the ejaculate of cats, with proportional distributions between the groups. Two subpopulations that were more resistant to sperm cooling were identified. As a practical application of the subpopulations study, individuals that are more resistant to semen cryopreservation, with longer longevity and with desirable characteristics of FIV can be identified.

Keywords: Spermatoc motion. Cooling Temperature. Cats. Multivariate Statistics. Computerized Analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E QUADROS

ARTIGO I

- Quadro 1 -** *Setup* utilizado no HTR-IVOS 14.0 para avaliação dos espermatozoides de felinos 64
- Figura 1 -** Gráficos representando a comparação das técnicas de colheita de espermatozoide (EEJ e EPD) e as duas temperaturas de refrigeração (-1°C e 4°C) em cada parâmetro..... 69

ARTIGO II

- Quadro 1 -** *Setup* utilizado no HTR-IVOS 14.0 para avaliação dos espermatozoides de felinos 88
- Figura 1 -** Dendograma mostrando a existência de três componentes principais (caixa CP1; CP2 e CP3) utilizando os parâmetros cinéticos obtidos na análise computadorizada de sêmen de felinos 89
- Figura 2 -** Comparação das variáveis da cinética espermática de felinos domésticos, no Grupo A (refrigerado a -1°C) e no Grupo B (refrigerado a 4°C), na subpopulação 1 (a), subpopulação 2 (b) e subpopulação 3 (c) no momento Fresco 92
- Figura 3 -** Comparação das variáveis da cinética espermática de felinos domésticos, no Grupo A (refrigerado a -1°C) e no Grupo B (refrigerado a 4°C), na subpopulação 1 (a), subpopulação 2 (b) e subpopulação 3 (c) após 24 horas de refrigeração 93
- Figura 4 -** Comparação das variáveis da cinética espermática de felinos domésticos, no Grupo A (refrigerado a -1°C) e no Grupo B (refrigerado a 4°C), na subpopulação 1 (a), subpopulação 2 (b), subpopulação 3 (c) após 48 horas de refrigeração 94

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

- Tabela 1 -** Resultados da mediana (mínimo-máximo) das análises microscópicas de espermatozoides de felinos domésticos, colhidos por eletroejaculação (EEJ), nas avaliações a fresco e após a refrigeração a -1°C e a 4°C por 24 horas e 48 horas.....65
- Tabela 2 -** Resultados da mediana (mínimo-máximo) das análises microscópicas de espermatozoides de felinos domésticos, colhidos por recuperados da cauda do epidídimo (EPD), nas avaliações a fresco e após a refrigeração a -1°C e a 4°C por 24 horas e 48 horas.....66
- Tabela 3 -** Porcentagem da redução das medianas (mínimo-máximo) dos valores entre o momento a fresco, 24 e 48 horas de refrigeração de espermatozoides colhidos por eletroejaculação (EEJ) de felinos domésticos67
- Tabela 4 -** Porcentagem da redução das medianas (mínimo-máximo) dos valores entre o momento a fresco, 24 e 48 horas de refrigeração de espermatozoides colhidos por recuperação da cauda do epidídimo (EPD) de felinos domésticos.....68

ARTIGO II

- Tabela 1 -** Mediana (25th – 75th) das subpopulações espermáticas (1 a 3) identificadas em felinos domésticos coletados por Eletroejaculação (EEJ) em três momentos (fresco, 24 e 48 horas de refrigeração) comparando o grupo A (refrigerado a -1°C) e o grupo B (refrigerado a 4°C).....90
- Tabela 2 -** Comparação entre as medianas do grupo A (refrigerado a -1°C) com o grupo B (refrigerado a 4°C), na subpopulação 1, 2 e 3, em cada momento (fresco, 24 e 48 horas de refrigeração)91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP®	Diluyente espermático à base de água de coco
ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
BCF	Frequência dos batimentos de cauda
Bps	Batimento por segundo
CASA	<i>Computer-assisted sperm analysis</i>
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CP	Componente Principal
EEJ	Eletroejaculação
EPD	Recuperação pela cauda do Epidídimo
F	Fresco
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
Hz	Hertz
IUCN	International Union for Conservation of Nature
LIN	Linearidade
REPROA	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal
RPM	Rotações por minuto
SMI	Índice de Movimento
SQ	Soma dos Quadrados VAP
SVI	Índice de Velocidade
STR	Retiniliaridade
UEL	Universidade Estadual de Londrina
V	Voltz
VAP	Velocidade do percurso médio
VCL	Velocidade Curvilínea
VSL	Velocidade Progressiva
WOB	Oscilação do movimento espermático
Z	Teste estatístico para padronização da amostra
24h	24 horas após a refrigeração
48h	48 horas após a refrigeração

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	TÉCNICA DE COLHEITA DE SÊMEN	18
2.2	REFRIGERAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DE FELINOS.....	19
2.3	AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA POR ANÁLISE COMPUTADORIZADA	22
2.4	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS	28
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA A IDENTIFICAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES	31
	REFERÊNCIAS	37
3	HIPÓTESE	48
4	OBJETIVOS	49
4.1	OBJETIVO GERAL.....	49
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	49
5	ARTIGO I – EFEITO DA REFRIGERAÇÃO A -1°C SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA DE FELINOS DOMÉSTICOS	50
	Resumo	50
	Abstract	51
	Introdução	52
	Materiais e Métodos	53
	Resultados	57
	Discussão	58
	Conclusão	60
	REFERÊNCIAS	61
6	ARTIGO II – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO SOB AS SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS DE FELINOS DOMÉSTICOS	73
	Resumo	73
	Abstract	74

Introdução	75
Materiais e Métodos	76
Resultados	79
Discussão	80
Conclusão	83
REFERÊNCIAS	83

7 CONCLUSÃO.....	95
-------------------------	-----------

ANEXOS	96
---------------------	-----------

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética.....	96
---	----

1 INTRODUÇÃO

A reprodução animal constitui um dos fatores de maior importância para sobrevivência das espécies. No entanto, a eficiência reprodutiva, principalmente em animais selvagens, ainda deixa a desejar, pois em 2016 foram descritas 39 espécies de felídeos ameaçados de extinção (IUCN, 2016). A principal causa da ameaça de extinção é o baixa performance reprodutiva (PAZ, 2004; SWANSON, 2006).

Neste contexto, a biotecnologia da reprodução é uma importante ferramenta para a manutenção das espécies, frente à necessidade de aumentar a eficiência reprodutiva desenvolvendo métodos que identifiquem os melhores reprodutores, aumentem a fertilidade das espécies, bem como, aperfeiçoe a reprodução por meio de métodos artificiais (FARSTAD, 2000). Os felinos domésticos tem assumido um papel fundamental como modelo experimental dos animais selvagens, na tentativa de compreender melhor a fisiologia reprodutiva e aprimorar a utilização da biotecnologia para a preservação das espécies (PUKAZHENTHI et al., 2001; ZAMBELLI ; CUNTO, 2006; MARTINS; JUSTINO, 2015).

Ainda esta, possibilita a manutenção e o transporte dos espermatozoides por diferentes regiões, impedindo o estresse causado no animal pelo transporte para fins de acasalamento. Apesar das células espermáticas manterem a capacidade de fertilização, a qualidade espermática pode reduzir após a queda da temperatura, ressaltando a importância de estabelecer protocolos ideais de temperatura e tempos de refrigeração (TEBET et al., 2006; COCCHIA et al., 2009).

Partindo do pressuposto que as características fisiológicas dos espermatozoides são espécie-específicos, os espermatozoides de felinos são mais resistentes a baixas temperaturas comparadas a outras espécies e embora tenham sido obtidos resultados positivos com sêmen refrigerado, não há uma definição da temperatura de refrigeração com altas taxas de sucesso (LUVONI et al., 2003).

A análise computadorizada do sêmen (*Computer-assisted sperm analysis - CASA*) foi desenvolvida com o objetivo de diminuir a subjetividade da avaliação espermática, uma vez que existe uma grande variabilidade nos padrões de movimento dos espermatozoides, dentro de um mesmo ejaculado (MORTIMER, 2000). As análises realizadas pelo sistema CASA são amplamente aceitas fornecendo resultados rápidos e objetivos dos parâmetros individuais de cada célula, sendo inadequada a seleção de apenas uma variável como, por exemplo, a motilidade, para definir a característica da amostra com precisão (MORTIMER, 2000).

Estudos que identifiquem as subpopulações espermáticas podem ser indicadores da qualidade dos espermatozoides, já que células com movimentos rápidos e lineares têm maior resistência à criopreservação e maior probabilidade de vencer as barreiras do trato reprodutivo feminino, para que ocorra a fertilização do oócito (MENDONZA et al., 2012; FERRAZ et al., 2014). Há na literatura apenas um artigo (CONTRI et al., 2012) identificando as subpopulações espermáticas em felinos, porém este não avalia o efeito da criopreservação sobre as células.

Mesmo com a disponibilidade da utilização da análise computadorizada do sêmen fornecendo informações confiáveis dos espermatozoides em tempo real. O estudo da cinética espermática ainda se encontra em desenvolvimento, sendo identificados poucos artigos utilizando a análise de cluster para a detecção das subpopulações (MARTINEZ-PASTOR et al., 2011). As populações espermáticas tem o papel de serem cada vez mais caracterizadas, identificando padrões com significados biológicos consistentes, assim como, relacionar as subpopulações específicas com fatores como criopreservação, capacitação e fertilização.

A identificação das subpopulações ainda se faz relevante para selecionar os machos que possuem uma maior porcentagem de subpopulações superiores e resistentes a criopreservação e que se adaptem melhor as biotecnologias. Futuramente, somente as

subpopulações superiores poderão ser selecionadas para a utilização de procedimentos mais caros como a FIV e a ICSI, garantindo melhores resultados.

O presente trabalho tem como objetivo identificar as subpopulações espermáticas de felinos domésticos utilizando estatística multivariada de espermatozoides colhidos por eletroejaculação e recuperação da cauda do epidídimo. Avaliar o efeito da criopreservação na distribuição de frequência de espermatozoides nas diferentes subpopulações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TÉCNICA DE COLHEITA DE SÊMEN

Para se realizar a colheita do sêmen, o conhecimento da anatomia, fisiologia e comportamento reprodutivo do macho são importantes e devem ser em sua grande maioria mimetizados. Para a obtenção do sêmen de felinos, as técnicas mais utilizadas são eletroejaculação (EEJ), vagina artificial e recuperação espermática da cauda do epidídimo (EPD).

A colheita de sêmen por eletroejaculação em felinos foi primeiramente relatada por Scott em 1970 e, em seguida, descrita em outros estudos como Platz et al. (1978) e Howard et al. (1990). Constitui-se no método de eleição para felinos selvagens e para a maioria de gatos domésticos por apresentar segurança para os animais, assim como para os manipuladores, além de possibilitar a colheita de animais agressivos (MORATO; BARNABÉ, 1998).

Para a EEJ, os animais são anestesiados e uma sonda ligada a eletrodos posicionados sobre a próstata, são realizados estímulos elétricos sequenciais, conforme descrito por Howard et al. (1990). Um problema recorrente desta técnica é a contaminação por urina, quando usadas altas voltagens (superior a 8V), errônea localização da sonda, assim como, alguns tipos de anestésicos como acepromazina, que nos gatos domésticos podem relaxar a musculatura do colo vesical (ZAMBELLI; CUNTO, 2006; MARTINS et al., 2014). Além disso, na EEJ é necessária a aquisição do material de procedimento e anestésicos, bem como o treinamento de toda a equipe envolvida.

A qualidade dos espermatozoides obtidos por EEJ pode ser menor ou até igual aos espermatozoides obtidos por vagina artificial (JIMÉNEZ-RABADÁN et al., 2012). A recuperação espermática da cauda do epidídimo (EDP) pode ser realizada em espécies em que

a preservação do material genético, após a orquiectomia, é necessária (MARTINS, 2007). Pode ser realizada em machos que foram castrados ou que venham a óbito, uma vez que os espermatozoides obtidos por esta técnica continuam viáveis com capacidade de fertilização (TSUTSUI et al., 2003). Além disso, as células oriundas do epidídimo são, em sua maioria, igualmente resistentes a refrigeração, não sofrendo danos significativos no acrossoma e na motilidade (YU; LEIBO, 2002; PONGLOWHAPAN et al., 2006; MARTINS, 2007).

Goodrowe e Hay (1993) relataram que espermatozoides recuperados de epidídimos de gatos apresentam motilidade espermática de aproximadamente 50%. Estudos comparando o padrão de motilidade entre as células espermáticas do ejaculado e do epidídimo descreveram uma heterogeneidade nas populações espermáticas (VAN DER HORST et al., 1999; TEBET et al., 2006; CONTRI et al., 2012). Contri et al (2012), ao compararem as subpopulações dos espermatozoides de felinos colhidos por EEJ e EPD, constataram que houve diferença ($p < 0,01$) entre as técnicas. Apesar de ambas terem sido caracterizadas com movimentos rápidos e progressivos no padrão de motilidade, a subpopulação predominante foi caracterizada por baixa velocidade e alta progressividade.

Informações sobre as características biológicas dos espermatozoides pré e pós ejaculação são importantes, sendo necessários mais estudos para esclarecer o significado da diferença na cinética dos espermatozoides nas subpopulações.

2.2 REFRIGERAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDEOS DE FELINOS

A criopreservação dos espermatozoides é uma ferramenta fundamental na reprodução assistida e tem como objetivo preservar a viabilidade do gameta masculino para futura fertilização do gameta feminino. É necessário o uso de reprodutores que tenham características reprodutivas superiores, e, principalmente, espermatozoides de alta qualidade

com significativa viabilidade espermática, tanto a fresco como refrigerado. O conhecimento das propriedades físicas e biofísicas dos espermatozoides é importante, pois ambas são afetadas durante a criopreservação (LUVONI et al., 2003).

A refrigeração é o método indicado para armazenamento e transporte rápido de sêmen (24 a 48 horas) e consiste na manutenção do material a 4 ou 5° C (HARRIS et al., 2001). A célula espermática sofre agressões durante o processo de refrigeração, apresentando alteração na permeabilidade da membrana plasmática de um estado fluido para um estado de gel durante a exposição a temperaturas baixas (15°C a 5°C); (WATSON, 2000). Neste processo os espermatozoides podem adquirir lesão acrossomal, comprometendo a capacidade de fertilização (TEBET et al., 2006). Uma das consequências da desestabilização das membranas por resfriamento é a reação prematura do acrossoma, diminuindo a longevidade dos espermatozoides. Estas alterações são semelhantes a capacitação parcial, pois a membrana reage de forma semelhante, por estarem permeáveis aos íons cálcio. Reação essa que só deveria ocorrer próximo ao local de fertilização (COCCHIA et al., 2009).

A habilidade espermática em resistir a queda de temperatura difere entre as espécies. Os espermatozoides felinos são pouco sensíveis ao choque térmico, se adaptando melhor a baixas temperaturas, enquanto que os de caprino, bovino e ovino tem média sensibilidade e os de suínos são extremamente sensíveis (WATSON; PLUMMER, 1985; ZAMBELLI et al., 2002). A tolerância de espermatozoides dos gatos a criopreservação é confirmada por Pukazhenthil et al. (1999) e Cocchia et al. (2009), os quais verificaram pouca diminuição da motilidade após a refrigeração. A explicação para esse fato é a diminuição do metabolismo a baixas temperaturas que mantém a viabilidade das células.

A sobrevivência dos espermatozoides refrigerados é afetada por vários fatores, como a temperatura utilizada, composição e concentração do diluente, tipo de armazenamento, velocidade dos processamentos de refrigeração e reaquecimento e, principalmente a qualidade

inicial do sêmen. Nos felinos domésticos, a curva de refrigeração de 0,5°C/ min foi proposta para minimizar os danos causados às membranas plasmáticas e acrossomais (PUKAZHENTHI et al., 1999). Entretanto, após a refrigeração, demonstraram perda da motilidade de 20 a 50% e aumento nas anormalidades acrossomais de 15 a 30% (ZAMBELLI et al, 2002; TEBET et al, 2006).

Autores recomendam a refrigeração lenta a 4°C para evitar o choque térmico e perda irreversível das células espermáticas (NUNES, 2008; 2010), porém, poucos estudos realizados demonstram o comportamento das células espermáticas de felinos em diferentes temperaturas de refrigeração. Tsutsui (2006) relatou a utilização do sêmen de felino na inseminação artificial intrauterina a uma menor temperatura de refrigeração (0°C), porém este apresentou baixa taxa de concepção (57%). Estudos demonstram a viabilidade espermática comparando o processo de criopreservação na temperatura de 4-5°C com a congelação a -196°C (CHATDARONG et al., 2006, 2009; GAÑÁN et al., 2009), porém, pouco se sabe sobre o comportamento das células espermáticas de felinos a temperaturas mais baixa de refrigeração.

A seleção de diluentes alternativos tem ocorrido para maior preservação dos espermatozoides à criopreservação (LIMA et al., 2014, 2016). Diluentes protetores são elaborados para manter e aumentar a viabilidade espermática, cuja função é nutrir os espermatozoides, ajustar o pH servindo como um tampão, proteger a célula contra choque térmico durante a refrigeração, combater possíveis contaminações bacterianas aumentando a vida útil do espermatozoide (HAMMERSTEDT et al., 1990). O diluente a base de água de coco vem alcançando resultados promissores, tanto por ser uma solução estéril, natural e disponível em abundância, como por apresentar longevidade na forma de pó (BARROS; TONIOLLI, 2011; LIMA et al., 2014, 2016). Tem sido produzido comercialmente, diminuindo a variabilidade de organismos biológicos da água de coco e tem como vantagem não conter ovo na sua composição, facilitando o transporte do sêmen. Possuem características

em potencial para a conservação do sêmen, como proteínas, sais, açúcares, vitaminas, fatores de crescimento (fito-hormônios) e muito pouco fosfolípideo, sendo ligeiramente ácido. Contudo, estes apresentam resultados conflitantes quando comparados aos diluidores convencionais (SILVA, 2008; EMERENCIANO et al., 2013; LIMA et al., 2014).

2.3 AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA POR ANÁLISE COMPUTADORIZADA

A avaliação espermática está inserida no exame andrológico, que consiste na avaliação do sistema reprodutor do macho, e é indicada para avaliação do potencial reprodutivo, assim como para a preservação do sêmen (VIEIRA et al., 2010; CBRA, 2013), possibilitando determinar se o animal está apto ou inapto à reprodução. A análise básica do ejaculado é feita primeiramente de forma macroscópica, a qual inclui volume, cor, odor e pH. Em seguida é realizada a análise microscópica avaliando a cinética, concentração, morfologia e integridade de membrana espermática.

A cinética espermática até a década de oitenta foi realizada por análise subjetiva, usando estimativa visual de parâmetros como motilidade e vigor, em microscópio óptico (KATZ; DAVIS, 1987). A motilidade representa o número de espermatozoides vivos e móveis da amostra, sendo os valores fornecidos em porcentagem (0 a 100%) e vigor significa a velocidade e a força que os espermatozoides se movimentam sendo classificados numericamente de 0 a 5. Por anos o método subjetivo foi o único utilizado, porém, estudos relatam uma variação de 30 a 60%, na análise dos parâmetros, devido à limitação do técnico em quantificar as subpopulações espermáticas, assim como por erro ou lentidão na técnica (JASKO et al., 1992; VERSTEGEN et al., 2002).

Sendo os resultados sujeitos à grande variação, ao longo de 40 anos, novas técnicas foram desenvolvidas, criando um novo método com alta acurácia, repetibilidade e livre das

tendências da análise subjetiva, surgindo assim a análise espermática computadorizada de imagens digitalizadas - CASA (AMANN; WABERSKI, 2014). Estes instrumentos demonstram precisão ao avaliar a cinética espermática, tornando-se essencial, principalmente, à pesquisa (MATOS et al., 2008). Na medicina veterinária, já foi observada a utilização para várias espécies (FERRAZ et al., 2014; SANTALORIA et al., 2015; AMANN e WABERSKI, 2014; GALLEGO et al., 2017), porém o aparelho CASA ainda é pouco utilizado na rotina.

A utilização do sistema CASA permitiu identificar as células espermáticas móveis e imóveis e o registro individual de suas trajetórias, detectando mudanças sutis nos parâmetros, sob várias condições experimentais (KRAEMER et al., 1998; FERREIRA, 2000). Este equipamento pode ainda ser utilizado para mensurar o número de células por unidade de volume, identificar subpopulações e capturar dados para classificação morfométrica de cada célula examinada em um curto período de tempo. Contudo, seu uso se torna limitado pelo elevado custo do equipamento e dificuldade na padronização dos diferentes *setups* utilizados (MORTIMER, 2000; AMANN; WABERSKI, 2014). Para a identificação do movimento individual de cada célula dentro do ejaculado, no caso do equipamento Hamilton Thorne (HTM-IVOS, version 14.0), é necessária a utilização de um software específico chamado EDITY/SORT.

A partir da análise computadorizada é possível calcular valores individuais e médios da motilidade total da amostra (%), motilidade progressiva (%), velocidade espermática ao longo de uma trajetória curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP - $\mu\text{m/s}$), velocidade espermática linear progressiva (VSL - $\mu\text{m/s}$), movimento de linearidade ($\text{LIN \%} = (\text{VSL/VCL}) \times 100$), retilinearidade ($\text{STR \%} = (\text{VSL/VAP}) \times 100$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH - μm), coeficiente de oscilação ($\text{WOB \%} = (\text{VAP/VCL}) \times 100$), frequência dos batimentos de cauda (BCF - Hz) e

concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$), obtida pelo número de espermatozoides por centímetro cúbico (BOYERS et al., 1989; VERSTEGEN et al., 2002; RIJSSELAERE et al., 2003).

O microscópico e o software responsável por extrair as informações são ligados a um computador. São capturadas 25 a 60 imagens por segundo, por meio de um sistema onde uma fonte de luz incide sobre um objeto em movimento e detectam as células com base na intensidade de pixels, dispersão da luz e na sua estrutura. Sabe-se que quanto maior o número de imagens capturadas por segundo, maior será o detalhamento da trajetória (AMANN; WABERSKI, 2014). O trajeto é obtido pela marcação de pontos (cabeças dos espermatozoides) e sua relação com o movimento da cauda (FERREIRA, 2000; MORTIMER, 2000; RIGLER et al., 2011). Cada espécie possui um *setup* diferente, programado com uma micrometragem mínima e outra máxima, pois o espermatozoide difere no tamanho total, na forma da cabeça, frequência de fixação abaxial da cauda, e, portanto, têm diferentes velocidades e padrões de movimento (MORTIMER; MAXWELL, 1999; AMANN; WABERSKI, 2014). São considerados espermatozoides aqueles objetos que estiverem dentro da faixa de tamanho delimitada no *setup*.

Para a análise, o software do sistema CASA identifica todas as cabeças dos espermatozoides no campo em avaliação e analisa as imagens de forma consecutiva, estabelecendo qual o próximo ponto em que a cabeça espermática estará dentro de uma zona de probabilidade, determinada pela distância máxima que um espermatozoide deveria se deslocar dentro do período de tempo. Após a localização da imagem sequencial da cabeça, suas coordenadas (x, y) são estabelecidas (AMANN; WABERSKI, 2014). Os valores cinéticos são calculados simultaneamente para cada espermatozoide do campo, baseados na reconstrução da trajetória. Esta reconstrução pode ser incorreta se houver a colisão entre dois espermatozoides, alterando a trajetória de ambos, mudando a classificação da motilidade. O

sistema pode rejeitar a análise se mais de uma célula estiver dentro de uma zona de probabilidade, caracterizando uma superestimação (MORTIMER, 2000).

A utilização do sistema CASA para mensuração da concentração espermática muitas vezes gera resultados imprecisos, não sendo confiável (IGUER-OUADA; VERSTEGEN, 2001). Se houver uma grande quantidade de células espermáticas no mesmo campo de visão, torna-se impossível o software reconstruir a trajetória do espermatozoide com precisão. Segundo alguns autores a concentração ideal indicada para análise é de 40 a 70×10^6 espermatozoides/mL (400 a 500 células por campo) (MORTIMER; SWAN, 1995; ESHRE ANDROLOGY SPECIAL INTEREST GROUP, 1998). Concentrações inferiores a 20×10^6 espermatozoides/mL podem gerar resultados de motilidade subestimados pela inclusão na contagem de partículas não espermáticas como debris, riscos, sedimentos, pois o sistema busca um limite mínimo de células para a leitura. Já em altas concentrações, os resultados gerados muitas vezes excluem as células que estão se deslocando mais rápido por causa do maior número de colisões, e pela proximidade uns dos outros (DRUDY et al. 1994).

Um dos desafios na utilização do sistema CASA é a comparação dos dados com outros laboratórios, ocorrendo utilização de *setups* diferentes, pois ainda não foi determinado um consenso mundial ou uma padronização. Sem uma validação interna significativa de cada medida de saída para cada instrumento ou sistema, um pesquisador ou uma central de reprodução não pode ter garantias de que os dados que servem de base para uma publicação ou produto comercializado são como indicados. Também não é possível realizar uma comparação fidedigna entre os trabalhos publicados (AMANN; WABERSKI, 2014).

Para a utilização da análise computadorizada é necessário treinamento por parte do profissional e atenção no momento da avaliação, pois muitos são os fatores que influenciam os resultados. Dentre eles: tipo de câmara utilizada; campo analisado; quantidade de campos mensurados; volume da amostra; concentração de espermatozoides na amostra; temperatura

de análise; tempo decorrido entre as análises das amostras; diluentes utilizados; modelo e versão do software; taxa de captura; microscópio e aumento utilizado (DOUGLAS-HAMILTON, 1995; ESHRE ANDROLOGY SPECIAL INTEREST GROUP, 1998; IGUEROUADA; VERSTGEN, 2001; GARCÍA-HERREROS, 2006; AMANN; WABERSKI, 2014).

Os primeiros pesquisadores que trabalharam com o sistema CASA, pensaram ser possível prever com precisão a fertilidade do macho, pela exatidão em que os movimentos espermáticos eram apresentados (LIU; WARME, 1977; AMANN, 1979; BOYERS et al., 1989). Entretanto, esta idealização não é coerente, uma vez que podem ocorrer eventos que alterem o percurso e as características espermáticas no trato reprodutivo feminino (AMANN; HAMMERSTEDT, 1993, 2002; HUNTER et al., 2011). Contudo, a análise computadorizada tem um papel fundamental na garantia da avaliação do ejaculado (AMANN; WABERSKI, 2014). Os benefícios da utilização do sistema CASA são muitos e este é amplamente aceito na rotina e nas pesquisas relacionadas a reprodução.

2.4 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS

Diferentes populações espermáticas, com movimentações específicas, têm sido estudadas por meio do sistema CASA para aprimorar o entendimento das características de uma amostra seminal. Estudos tornaram claro que a abordagem clássica de considerar o ejaculado como população homogênea não é válido (MORTIMER, 2000; MARTINEZ et al., 2006; CONTRI et al., 2012). O ejaculado é composto por um grupo heterogêneo de subpopulações espermáticas, as quais apresentam respostas variadas quanto aos padrões de motilidade (QUINTERO- MORENO et al., 2003; 2007; MARTINEZ et al., 2006; MUIÑO et al., 2008^a; 2009; DORADO et al., 2010; 2011a; BRAVO et al., 2011; KANUGA et al., 2012; PEÑA et al., 2012; MAYA-SORIANO et al., 2015) e morfometria (PENÃ et al., 2005;

VALLE et al., 2012; MARTÍ et al., 2012; MAROTO-MORALES et al., 2012; VICENTE-FIEL et al., 2013).

A existência de subpopulações espermáticas tem sido reconhecida e demonstrada em ejaculados de gato (CONTRI et al., 2012), cão (NÚÑEZ-MARTÍNEZ et al., 2006; DORADO et al., 2011b; PEÑA et al., 2012), garanhão (QUINTERO-MORENO et al., 2003), jumento (MIRÓ et al., 2005; FLORES et al., 2008), bode (DORADO et al., 2010; VÁZQUEZ et al., 2015), carneiro (BRAVO et al., 2011; MENDONZA et al., 2012; MARTÍ et al., 2012; MAROTO-MORALES et al., 2012; SANTALORIA et al., 2015), cachoço (ABAIGAR et al., 1999; FLORES et al., 2008, 2009), touro (MUIÑO et al., 2009), cervo (ABAIGAR et al., 2001; BERACOCHEA et al., 2014), coelho (QUINTERO-MORENO et al., 2007; MAYA-SORIANO et al., 2015) e peixes (BEIRÃO et al., 2011; KANUGA et al., 2012; GALLEGO et al., 2017)

Embora a origem e a fisiologia dessas subpopulações não sejam claras, acredita-se que a diferença das células ocorra durante a espermatogênese influenciada pela genética, e sua estrutura é modificada pela maturação, uma vez que há a presença de espermatozoides com idades diferentes no epidídimo (ABAIGAR et al., 1999; MARTINEZ-PASTOR et al., 2008). Há evidências de que a heterogeneidade do ejaculado pode ter significado funcional, assim como ter variação quanto à fertilidade da amostra (THURSTON et al., 1999; NÚÑEZ-MARTÍNEZ et al., 2006; QUINTERO-MORENO et al., 2007; MENDOZA et al., 2012; MAYA-SORIANO et al., 2015; SANTOLARIA et al., 2015; GALLEGO et al., 2017).

Curry (2000) afirmou que a maior heterogeneidade de espermatozoides dentro do ejaculado, garantiria maior potencial de fertilização. Com isso, é possível propor que alguns indivíduos, mesmo com valores de motilidade semelhantes, possam apresentar maior fertilidade por apresentarem maior heterogeneidade no ejaculado (HOLT; VAN LOOK, 2004), ou que subpopulações com movimentos específicos possam ter maior sucesso no

processo de fertilização (DE PAZ et al., 2011; RAMÓN et al., 2013; YÁNIZ et al., 2015; SANTALORIA et al., 2015).

A motilidade espermática, ainda hoje, é o parâmetro mais utilizado para fornecer informações sobre a qualidade do sêmen, pois demonstra a presença de movimento espermático. Contudo, mesmo sendo a primeira variável analisada, inclusive na análise computadorizada, estudos tem demonstrado que é necessária a avaliação das características da cinética espermática, pois se alteram conforme espécies, indivíduos, ejaculados e também aos desafios que são submetidos, não podendo ser considerados sempre padronizados. A observação apenas dos valores médios da motilidade faz com que tenham grande perda de informações por considerar o ejaculado uniforme (AMANN; GRAHAM, 1993; MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2011), além de mascarar os diferentes estados bioquímicos das células, não sendo portanto uma abordagem adequada (ABAIGAR et al., 1999; MORTIMER, 2000; HOLT; HARRISON, 2002; MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2011).

O desenvolvimento do sistema CASA permitiu a obtenção de informações objetivas sobre as características cinéticas dos espermatozoides presentes no ejaculado (AMANN; WABERSKI, 2014). Na tentativa de identificar as subpopulações, vários trabalhos recentes usaram *softwares* específicos e procedimentos estatísticos multivariados para investigar melhor o ejaculado das espécies, fornecendo informações relevantes sobre as características biológicas do espermatozoide e as alterações comparando espécies (FLORES et al., 2008; VICENTE-FIEL et al., 2013), técnicas de colheita de sêmen (CONTRI et al., 2012; VÁZQUEZ et al., 2015) e mudanças nas características dessas células após a criopreservação (NÚÑEZ-MARTÍNEZ et al., 2006; MARTINEZ et al., 2006; MUIÑO et al., 2008; 2009; FLORES et al., 2009; DORADO et al., 2011; BEIRÃO et al., 2011; PEÑA et al., 2012; FERRAZ et al., 2014; GALLEGO et al., 2017).

O processo de criopreservação acarreta uma série de alterações resultando em uma marcante redução da fertilidade. Os padrões de distribuição das subpopulações de espermatozoides variam quando submetidos à mudanças de temperatura (MARTINEZ et al., 2006; DORADO et al., 2011a). No conhecimento dos autores, a maior parte dos estudos de criopreservação envolvendo subpopulações foi realizada comparando a diferença do movimento espermático após a congelação do sêmen (MUIÑO et al., 2008; FLORES et al., 2008, 2009; DORADO et al., 2011b; MARTÍ et al., 2011; BEIRÃO et al., 2011; PEÑA et al., 2012; FERRAZ et al., 2014), sendo pouco os artigos demonstrando as características espermáticas após a refrigeração em outras espécies como ovinos, cães e peixes (MENDONZA et al., 2012; DORADO et al., 2011a; GALLEGO et al., 2017).

Os espermatozoides refrigerados apresentam valores mais baixos da cinética comparados a fresco, sendo descritos com mudanças nas características de alta velocidade e progressividade para aquelas com uma velocidade mais baixa e trajetórias não progressivas (DORADO et al., 2011a). Na lógica, espermatozoides com movimentos lentos e não progressivos teriam uma dificuldade maior em percorrer o trato genital feminino (SHALGI et al., 1992; KING et al., 2000), assim como evidências sugerem que após a criopreservação, os espermatozoides podem iniciar mudanças semelhantes à capacitação em uma proporção dos sobreviventes (LEAHY; GADELLA, 2011) e essa hiperativação exagerada pode indicar menor longevidade e uma baixa capacidade de fertilização da amostra (PETRUNKINA et al., 2007).

O predomínio de uma subpopulação que melhor se adapta à criopreservação tem sido apresentado com características de movimentos mais rápidos e progressivos, mostrando uma maior longevidade espermática (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2005; QUINTERO-MORENO et al., 2003; MUIÑO et al., 2008). Bravo et al. (2011), comparando as subpopulações de espermatozoides frescos de carneiros nas diferentes sazonalidades, mostraram que o

comportamento das mesmas se mantiveram homogênea, contrário do que ocorreu após o processo de criopreservação, demonstrado por vários pesquisadores (MUIÑO et al. 2009; DORADO et al., 2011; FERRAZ et al., 2014; GALLEGO et al., 2017), na qual houve a modificação dos padrões de motilidade, alterando a relação das subpopulações.

Dorado et al. (2011) constataram aumento significativo nas porcentagens de anormalidades totais, alterações de acrossoma e nos parâmetros derivados do sistema CASA (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF), com exceção da motilidade total, nos espermatozoides refrigerados de cães. Eles estabeleceram que as mudanças induzidas pela refrigeração estavam ligadas a mudanças na distribuição da frequência de espermatozoides dentro de subpopulações, sugerindo que a capacidade de resistir à preservação a 4-5° C pode estar relacionada com alterações específicas tanto nas estruturas das subpopulações de espermatozoides móveis quanto nas características de movimento de cada subpopulação. Estes resultados apontaram um papel importante na manutenção de uma estrutura subpopulacional específica em ejaculados de mamíferos, independentemente da espécie, demonstrando que espermatozoides modificados têm sido relacionados à criopreservação (FLORES et al., 2009).

A identificação de subpopulações de espermatozoides capazes de sobreviver e manter movimentos progressivos após um determinado período de refrigeração se faz relevante no estudo da biotecnologia da reprodução, uma vez que podem indicar boa ou má qualidade da amostra (DAVIS et al., 1995; PEÑA et al., 2012). E a manutenção de uma estrutura de subpopulação global resistente à criopreservação poder ser importante para manter a função geral do ejaculado quando submetidas a desafios (FLORES et al., 2008).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA A IDENTIFICAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES

A análise estatística aplicada aos parâmetros avaliados pelo sistema CASA se mostra pouco informativa, provavelmente, devido à escolha inadequada dos testes e a análise inapropriada dos resultados (SOUSA et al., 2013). Por este motivo, a abordagem dos detalhes da análise estatística por cluster, se faz necessária para a identificação das subpopulações espermáticas (MARTINEZ-PASTOR et al., 2011).

A análise de cluster faz parte da estatística multivariada, sendo um procedimento exploratório e descritivo, que tem como objetivo, analisar a estrutura e relacionar os aspectos dos dados entre si, ajudando na formação da classificação, ou seja, identificar subgrupos homogêneos (*cluster*) em uma população, de forma a reduzir ao máximo a variabilidade entre os mesmos. Portanto, a análise de cluster é a arte de encontrar grupos similares nos dados, por meio de procedimentos estatísticos sofisticados, relacionando apenas as semelhanças ou dissemelhanças entre eles, sem definir previamente critérios de inclusão em qualquer agrupamento (KAUFMAN; ROUSSEEUW, 1990; MIRKIN, 1996).

Ao realizar a análise de cluster é necessário seguir etapas e compreender os seguintes procedimentos: seleção de variáveis; transformação de variáveis; seleção da medida de semelhança/ dissemelhança, escolha do método de formação de cluster; discussão e apresentação dos dados. Alguns critérios devem ser levados em conta, como retirar variáveis que não tenham relevância para o estudo, uma vez que podem interferir na análise, assim como cuidar para não deixar de fora variáveis importantes para o estudo. Price (1993) sustentou a teoria de que quanto maior o número de variáveis, mais fraca é a identificação dos *clusters*. Por outro lado, o *cluster* poderá não ser esclarecedor com poucas variáveis, omitindo informações importantes para a interpretação dos dados.

A atribuição de peso às variáveis influencia a formação dos *clusters*. Há descrito na literatura quatro formas de determinar os pesos: (1º) o investigador atribuir o peso igual a zero, deixando a variável fora da matriz de dados; (2º) realizar a análise de correlação

achando as altamente correlacionadas, usando então a análise de componentes principais (CP), sendo uma base para descrever o objeto, pois reduz o número de variáveis em poucos grupos, se assemelhando em características, como padrão de velocidade e padrão de movimento (DORADO et al., 2010; VÁZQUEZ et al., 2015); (3°) escolher uma função de padronização; (4°) atribuir o peso de acordo com a repetição da matriz, sendo que a importância da variável decresce com o aumento da sua variabilidade (instabilidade) (QUINTAL, 2006). A atribuição de pesos às variáveis depende do objetivo e do contexto da investigação, refletindo a importância que o investigador atribui às diferentes variáveis na tarefa da classificação.

A técnica dos CPs faz parte da estatística multivariada e realiza a redução de grupos pela transformação de variáveis relacionadas. Esta redução facilita a interpretação da estrutura dos dados e as análises subsequentes. Cada CP é a combinação linear das variáveis originais. A medida da quantidade de informação e a relevância aparecem ordenadas segundo a magnitude da variância, tendo como primeiro o CP mais informativo para a interpretação da análise, enquanto a menos informativa fica por último (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2011; VÁZQUEZ et al., 2015). Com isso, a compreensão dos dados fica mais simplificada pela menor quantidade de informações analisadas, assim como é possível optar por analisar apenas os primeiros CP (QUINTAL, 2006).

Para realizar a análise de *cluster*, é necessário também que todas as variáveis tenham o mesmo peso no que diz respeito às unidades de medida e à variância. Portanto, a padronização anula a influência das diferentes unidades de medida. Contudo, em algumas situações poderão existir variáveis com uma importância superior a qual deverá ser mantida (QUINTAL, 2006). A padronização (Teste Z_{ij}) converte as variáveis originais em variáveis sem unidades de medida, transformando todos em desvio padrão dentro da curva de normalidade, observando o quanto se afasta ou aproxima da média. Após a transformação, a identificação e remoção de

outliers podem ser feitas observando os dados ou aplicando métodos estatísticos. Porém, pelo fato da análise de cluster ser um método descritivo, essa transformação se faz menos importante do que em métodos inferenciais.

A representação gráfica de dados multivariados é importante em todas as fases da análise de *clusters*. Antes de iniciar as avaliações, a representação gráfica ajuda a escolher a medida de semelhança/dissemelhança que melhor reflete o “comportamento” dos dados ou o método mais indicado para a construção dos clusters, evidenciando a escolha mais adequada do número de *clusters* (CATTEL, 1966; QUINTAL, 2006). Para os métodos hierárquicos há várias versões de dendogramas, elaborados por *softwares* que representam os dados multivariados de forma interativa. Os dendogramas mostram como os sucessivos grupos vão se formando ao longo do processo hierárquico.

O dendograma é uma representação matemática pictural do procedimento de construção de *clusters* completo e também pode ser conhecido como diagrama de árvore. O dendograma ilustra as fusões ou divisões em cada nível da análise de *clusters* onde o valor da medida de proximidade em cada passo do processo hierárquico é semelhante a uma árvore (VICINI, 2005). Os nós do dendograma representam os *clusters* e o tamanho do tronco (altura) representa a distância a que os *clusters* se juntam. A ligação entre nós e troncos dá-nos a disposição da árvore. A escolha do número de *clusters* pode ser feita baseada no tamanho relativo do nível de fusão do dendograma (valor da proximidade derivada) e é conhecido por “upper tail rule” ou por meio de uma aproximação visual que identifica quebras no gráfico das variáveis contra o número de *clusters* (MOJENA, 1977).

Os algoritmos de agrupamento para a construção dos *clusters* são geralmente classificados em dois grandes grupos: hierárquicos ou não hierárquicos. Nos métodos hierárquicos, os grupos formam os elementos em ordem de acordo com seu valor, cujo grupo ou não tem nenhum elemento em comum ou um deles está contido no outro e uma vez

realizados são irreversíveis. O método mais utilizado é o de algoritmos aglomerativos, cujas variáveis vão sendo agrupadas sucessivamente até se encontrar um grupo que inclua a totalidade dos parâmetros (BRANCO, 2004). O critério de Ward é o teste de preferência pela sensibilidade a valores extremos ou *outliers*, sendo também o teste de eleição para a identificação das subpopulações. Este teste utiliza uma abordagem diferente dos demais, avaliando as distâncias entre os grupos (clusters) pela análise de variância. O método tenta minimizar a soma dos quadrados (SQ) de dois grupos hipotéticos que podem ser formados a cada passo. O método é eficiente, mas tende a criar grupos de tamanhos pequenos.

Quanto aos métodos não hierárquicos, na análise de *cluster* tem como vantagem de serem aplicados em matrizes de dados muito grandes, uma vez que não é preciso calcular e armazenar uma nova matriz de dissemelhança em cada passo do algoritmo, além de serem capazes de reagrupar os objetos em *clusters* diferentes daqueles em que foram colocados inicialmente. Contudo, a desvantagem desse método é a necessidade de definir o número de grupos sem mesmo conhecer a estrutura dos dados. Por isso, na maioria dos trabalhos de subpopulações (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2011) tem realizado primeiramente o método hierárquico aos dados para determinar o número de *clusters*, em vez de escolher aleatoriamente ou depender da subjetividade e conhecimento do investigador, e posteriormente o método não hierárquico.

O método das *k-means* usado de forma não hierárquica, em contraste com o método hierárquico, não utiliza a matriz de proximidade inicial, mas sim a matriz dos dados inicial. A partir de um conjunto de dados é construída uma partição e se baseia em manter critérios de homogeneidade entre os grupos, ter coesão interna e ser heterogêneo com os outros grupos. Este mede a proximidade entre grupos usando a distância euclidiana entre os centróides dos grupos (JOHSON; WICHERN, 2002). Também podem servir como complemento para o método hierárquico.

Para avaliar se há diferença significativa entre as variáveis e grupos, foram usados testes de inferência (Kruskal Wallis e Mann Whitney) para extrair o valor_p, o qual indica a chance ou a probabilidade da diferença observada entre as variáveis/grupos ser devido ao acaso, e não aos fatores que estão sendo estudados. Para complementar o teste de significância estatística é realizado o cálculo para avaliar o tamanho do efeito (d_z de Cohen) padronizado considerando a variabilidade e as diferenças entre as médias, a partir do escore Z. Esta medição de uma potencial significância real de um efeito, por meio do tamanho, é independente de um possível efeito enganoso em função do tamanho da amostra (SELYA et al., 2012). A classificação do tamanho do efeito é interpretada como: valores superiores ou iguais a 0,8 representam tamanho de efeito grande; entre 0,8 a 0,4 são considerados médios, entre 0,4 e 0,2 são pequenos e inferiores a 0,2 considerados insignificantes. O efeito baixo indica que, quando comparado dois grupos, apesar da significância estatística (valor_p) apontar diferença entre ambos, esta possui pouca relevância (LINDENAU; GUIMARÃES, 2012).

A formação de *clusters* é um processo subjetivo, o que torna o processo de escolha do método, a determinação do número de *clusters* e sua interpretação complicadas. O mesmo conjunto de dados poderá ser dividido de forma diferente conforme o método, o investigador e as técnicas usadas. Para verificar se os resultados foram coerentes e não impostos há a possibilidade de se observar critérios para a validação dos resultados (JAIN; DUBES, 1988) como, por exemplo, comparar a classificação do presente trabalho com um conjunto de dados padrão já utilizado (MARTINEZ-PASTOR et al., 2011). Uma vez caracterizados os padrões de subpopulação, seria desejável usar conjuntos de dados validados como um guia para classificar novos conjuntos de dados, em vez de repetir o processo de agrupamento.

Por fim, mesmo a estatística apresentando valores coerentes, os pesquisadores devem analisar cuidadosamente os resultados, comparando com espermatozoides fisiológicos e resultados de fertilidade, pois uma solução de cluster pode não ter significado biológico.

REFERÊNCIAS

- ABAIGAR, T.; HOLT, W.; HARRISON, R.; DEL BARRIO, G. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. **Biology of Reproduction**, 60, 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 ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. **Reproduction**, 122, 265–73, 2001.
- AMANN, R.P. Computerized measurements of sperm velocity and percentage of motile sperm. In: Fawcett DW, Bedford GM, editors. *The Spermatozoon*. Baltimore, MD: **Urban & Schwarzenberg**, 431–435, 1979.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function, *Equine Reproduction*. Philadelphia: **Lea & Febiger**, 715–45, 1993.
- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, 14, 397–406, 1993.
- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. Detection of differences in fertility. **Journal of Andrology**, 23, 317–325, 2002.
- AMANN, R.P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology**, 81, 5–17, 2014.
- BARROS, T. B.; TONIOLLI, R. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35, 4, 400-407, 2011.
- BEIRÃO, J.; CABRITA, E.; PÉREZ-CEREZALES, S.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; HERRÁEZ, M.P. Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. **Cryobiology** 62, 22–31, 2011.
- BERACOCHEA, F.; GIL, J.; SESTELO, A.; GARDE, J.J.; SANTIAGO-MORENO, J.; FUMAGALLI, F.; UNGERFELD, R. Sperm characterization and identification of sperm subpopulations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Animal Reproduction Science**, 149, 224–230, 2014.
- BOYERS, A.P.; HUNTER, A.G.; SEAL, U.S.; BINCZIK G.A.; REINDL, N.J.; TILSON, R.L. In-vitro induction of capacitation of fresh and frozen spermatozoa of the Siberian tiger (*Panthera tigris*). **Journal of reproduction and fertility**, 86, 599-607, 1989.
- BRANCO, J. Uma Introdução à análise de clusters, **Sociedade Portuguesa de Estatística**, 2004.
- BRAVO, J.A.; MONTANERO, J.; CALERO, R.; ROY, T.J. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. **Animal Reproduction Science**, 129, 22– 29, 2011.

CATTEL, R. B. The scree test for the number of factors. In: ---. **Multivariate behavior research**, 1, 245-276, 1966.

CBRA - **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 104, 2013.

CHATDARONG, K.; BOONYEN, T.; RUNGSUK, K.; CHOWTRAKUL, C.; LOHACHIT, C. Freezing of cat epididymal spermatozoa after cold storage. **Chulalongkorn University Faculty of Veterinary Science**, Bangkok, Thailand, 26-29 Oct 2006.

CHATDARONG, K.; THUWANUT, P.; SUKSAMAI, P.; PATANATIRADAJ, S.; SANGWORNACHASUP, A. Survival of Frozen-Thawed Cat Spermatozoa Pre-Cooled in the Epididymides. **Reproduction Domestic Animals**, 44, 2, 377–380, 2009.

COCCHIA, N.; CIANI, F.; EL-RASS, R.; RUSSO, M.; BORZACCHIELLO, G.; ESPOSITO, V.; MONTAGNARO, S.; AVALLONE, L.; TORTORA, G.; LORIZIO, R. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use assisted reproduction. **Zygote**, 18, 1-8, 2009.

CONTRI, A.; ZAMBELLI, D.; FAUSTINI, M.; CUNTO, M.; GLORIA, A.; CARLUCCIO, A. Artificial neural networks for the definition of kinetic subpopulations in electroejaculated and epididymal spermatozoa in the domestic cat. **Reproduction**, 144, 339–347, 2012.

CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, 5, 46–52, 2000.

DAVIS, R.O.; DROBNIS, E.Z.; OVERSTREET, J.W. Application of multivariate cluster, discriminate function, and stepwise regression analyses to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. *Fertility and Sterility*, 63, 1051–1057, 1995.

DORADO, J.; MOLINA, I.; MUÑOZ-SERRANO, A.; HIDALGO, M. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. **Theriogenology**, 74, 795–804, 2010.

DORADO, J.; GÁLVEZ, J.M.J.; MURABITO, M.R.; MUÑOZ-SERRANO, A., HIDALGO, M. Identification of sperm subpopulations in canine ejaculates: Effects of cold storage and egg yolk concentration. **Animal Reproduction Science**, 127, 106– 113, 2011a.

DORADO, J.; ALCARÁZ, L.; DUARTE, N.; PORTERO, J.M.; ACHA, D.; HIDALGO, M. Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. **Animal Reproduction Science**, 125, 211– 218, 2011b.

DOUGLAS-HAMILTON, D.H. Validation procedures for the Hamilton Thorne Integrated Visual Optical System sperm and cell analyzer. **Accreditation and Quality Assurance**, 4, 340–347, 1995.

DRUDY, L.; LEWIS, S.E.M.; BARRY-KINSELLA, C.; HARRISON, R.F.; THOMPSON, W. Endometriosis: The influence of peritoneal fluid from patients with minimal stage or treated endometriosis on sperm motility parameters using computer-assisted semen analysis. **Human Reproduction**, 9, 2418-2423, 1994.

EMERENCIANO, K.D.M.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X.; SILVA, M.A.; OLIVEIRA, M.G.C.; PAULA, V.V.; SILVA, A.R. Recuperação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos (*Felis catus*) utilizando soluções à base de tris ou água de coco em pó. **Acta Veterinaria Brasilica**, 7, 2, 148-153, 2013.

ESHRE Andrology Special Interest Group. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. **Human Reproduction**, 13, 142–145, 1998.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, 60–61, 375–387, 2000.

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

FERREIRA, J.C.P. Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelamento do sêmen equino. **Tese de Doutorado** - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu, 2000.

FLORES, E.; TABERNER, E.; RIVERA, M.M.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; MIRÓ, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. **Theriogenology**, 70, 936–945, 2008.

FLORES, E.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J.M.; PEÑA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. **Theriogenology**, 72, 784–797, 2009.

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

GAÑÁN, N.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E.R.S. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5 °C on sperm quality and cryopreservation. **Theriogenology**, 72, 1268–1277, 2009.

GARCIA-OLIVARES, A.; GARZON-PEREZ, C.; GUTIERREZ-PEREZ, O.; MEDRANO, A. Effect of cooling to different sub-zero temperatures on boar sperm cryosurvival. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, 5, 1 63–66, 2016.

GOODROWE, K.L.; HAY, M.A. Characteristic and zona binding ability of fresh and colled domestic cat spermatozoa, **Theriogenology**, 40, 967-975, 1993.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, 11, 73- 88, 1990.

HARRIS, R.F.; POPE, C.E.; GOMEZ, M.C.; LEIBO, S.P.; DRESSER, B.L. Storage of domestic cat spermatozoa for extended periods at 4 8C. **Theriogenology**, 55, 308, 2001 [Abstract].

HOLT, W.V.; HARRISON, R.A.P. Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. **Journal of Andrology**, 23, 557–565, 2002.

HOLT, W.V.; VAN LOOK, K.J.W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. **Reproduction**, 127, 527–535, 2004.

HOWARD, J.G.; BROWN, J.L.; BUSH, M.; WILDT, E.D. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing, **Journal of Andrology**, 11, 204-215, 1990.

HUNTER, R.H.; COY, P.; GADEA, J.; RATH, D. Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilization. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 28, 191–197, 2011.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. Evaluation of the "Hamilton Thorn Computer-based Automated System" for dog semen analysis. **Theriogenology**, 55, 733-749, 2001.

IUCN. Red List of Threatened Species. Version 2016-3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 14 December 2016.

JAIN, A.K. e DUBES, R.C. Algorithms for Clustering Data, Englewood cliffs, NJ, **Prentice Hall**, 1988.

JASKO, D.J.; LITTLE, T.V.; LEIN, D.H.; FOOTE R.H. Comparison of spermatozoa movement and semen characteristic with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). **Journal of American Veterinary Medical Association**, 200, 979-985, 1992.

JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; DEL OLMO, E.; PÉREZ-GUZMÁN, M.D.; BISBAL, A.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; GARDE, J.J.; SOLER, A.J. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation): extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. **Animal Reproduction Science**, 132, 88–95, 2012.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. Applied multivariate statistical analysis. 5. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002.

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

- KATZ, D.F.; DAVIS, R.O. Automatic analysis of human semen motion. **Journal of Andrology**, 8, 170-81, 1987.
- KAUFMAN, L.; ROUSSEEUW, P. J. Finding Groups in Data, An Introduction to Cluster Analysis, **Wiley Inter-science**, Canadá, 1990.
- KING, L. M.; HOLSBERGER, D.R.; DONOGHUE, A.M. Correlation of CASA Velocity and Linearity Parameters With Sperm Mobility Phenotype in Turkeys. **Journal of Andrology**, 21, 1, 2000.
- KRAEMER, M.; FILLION, C.; MARTIN-PONT, B.; AUGER, J. Factors influencing human sperm kinematic measuring by the celltrak computer-assisted sperm analysis system. **Human Reproduction**, 13, 611-619, 1998.
- LEAHY, T.; GADELLA, B.M. Capacitation and capacitation-like sperm surface changes induced by handling boar semen. **Reproduction. Domestic Animals**, 46 (Suppl. 2), 7-13. 2011.
- LIMA, D.B.C; SILVA, T.F.P.; AQUINO-CORTEZ, A.; PINTO, J.N.; CALDINI, B.N.; MAGALHÃES, F.F.; SILVA, L.D.M. Avaliação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos após recuperação com ACP-117c ou TRIS, adição de gema e refrigeração a 4 °C por 24h. **Ciência Animal**, 24, 03-10, 2014.
- LIMA, D.B.C.; SILVA, T.F.P.; AQUINO-CORTEZ, A.; PINTO, J.N.; MAGALHÃES, F.F.; CALDINI, B.N.; SILVA, L.D.M. Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and Tris extenders. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, 68, 4, 873-881, 2016.
- LINDENAU, J. D.; GUIMARÃES, L.S.P. Calculating the Effect Size in SPSS. **Revista HCPA**, 32, 3, 2012.
- LIU, Y.T.; WARME, P.K. Computerized evaluation of sperm cell motility. **Computers and Biomedical Research**, 10, 127-138, 1977.
- LUVONI, G.C.; KALCHSCHMIDT, E.; LEONI, S.; RUGGIERO, C. Review Conservation of feline semen Part I: Cooling and freezing protocols. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 5, 203-208, 2003.
- MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; SOLERA, A.J; FERNÁNDEZ-SANTOSA, M.R.; ROLDANC, E.R.S.; GOMENDI OC, M.; PÉREZ-GUZMÁN B, M.D., GARDEA, J.J. Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in ram ejaculates: Intra- and interindividual variation. **Theriogenology**, 77, 1529-1539, 2012.
- MARTINEZ, I.N.; MORAN, J.M.; PENA, F.J. Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. **Journal of Andrology**, 27, 596-603, 2006.

MARTINEZ-PASTOR, F.; DIAZ-CORUJO, A.; ANEL, E.; HERRAEZ, P.; ANEL, L.; DE PAZ, P. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. **Theriogenology**, 64, 958–974, 2005.

MARTINEZ-PASTOR, F.; CABRITA, E.; SOARES, F.; ANEL, L.; DINIS, MT. Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts. **Reproduction**, 135, 449–459, 2008.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; TIZADO, E. J.; GARDE, J. J.; ANEL, L.; PAZ, P. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. **Theriogenology**, 75, 783–795, 2011.

MARTINS, M.I.M. Perspectivas da aplicação comercial de biotecnologias envolvendo espermatozóides obtidos de epidídimo de cães e gatos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 31, 115-118, 2007.

MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; ACKERMANN, C.L. Biotécnicas do sêmen. In: Wilter Ricardo Russiano Vicente; Maricy Apparicio. (Org.). **Reprodução e obstetrícia em cães e gatos**. 1ed. Curitiba: Editora MEDVET Ltdap, 339-362, 2014.

MARTINS, M; JUSTINO, R. Criopreservação espermática em felinos: estado da arte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 39, 1, 136-140, 2015.

MARTÍ, J.I.; APARICIO, I.M.; LEAL, C.L.V.; GARCÍA-HERREROSC, M. Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality parameters in ram ejaculates. **Theriogenology**, 78, 528–541, 2012.

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Análise computarizada de espermatozóides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 32, 4, 225-232, 2008.

MAYA-SORIANO, M.J.; TABERNER, E.; SABÉS-ALSINA, M.; RAMON, J.; RAFEL, O.; TUSELL, L.; PILES, M.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Daily exposure to summer temperatures affects the motile subpopulation structure of epididymal sperm cells but not male fertility in an in vivo rabbit model. **Theriogenology**, 84, 384–389, 2015.

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

MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, London, 20, 4, 359-363, 1977.

MIRKIN, B. Mathematical Classification and Clustering, **Kluwer Academic Publishers**, London, 1996.

- MIRÓ, J.; LOBO, V.; QUINTERO-MORENO, A.; MEDRANO, A.; PEÑA, A.; RIGAU, T. Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. **Theriogenology**, 63, 1706–1716, 2005.
- MORATO, R.G.; BARNABE, R.C. Biotécnicas de Reprodução Aplicadas à Preservação de Felídeos Selvagens. **Clinica Veterinária**, 12, 24-26, 1998.
- MORTIMER, S.T. CASA – Practical aspects. **Journal of Andrology**, 21, 515–24, 2000.
- MORTIMER, S.T.; MAXWEL, W.M.C. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. **Reproduction Fertility Development**, 11, 25-30, 1999.
- MORTIMER, S.T.; SWAN, M.A. Variable kinematics of capacitating human spermatozoa. **Human Reproduction**, 10, 3178–3182, 1995.
- MUIÑO, R.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C.O.; PEÑA, A.I. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science**, 109, 27–39, 2008a.
- MUIÑO, R.; PEÑA, A.I.; RODRÍGUEZ, A.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C.O. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. **Theriogenology**, 72, 860–868, 2009.
- NUNES, D.B.; ZORZATTO, J.R.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. **Animal Reproduction Science**, 104, 434-439, 2008.
- NUNES, J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução de pequenos ruminantes. Fortaleza: **Tecnograf**, 208, 2010.
- NUNEZ-MARTINEZ, I.; MORAN, J.; PENA, F. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. **Reproduction Domestic Animals**, 41, 408–15, 2006.
- de PAZ, P., MATA-CAMPUZANO, M., TIZADO, E.J., ALVAREZ, M., ALVAREZ-RODRÍGUEZ, M., HERRAEZ, P., ANEL, L. The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition and analysis used. **Theriogenology**, 76, 1313–1325, 2011.
- PAZ, R. C.R. Biotecnologias da reprodução utilizadas como ferramentas auxiliares no manejo e conservação de duas espécies de felinos selvagens: *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus*. (Reproduction biotechnologies as an important tool in the management and conservation of wild cats: *Leopardus pardalis* and *Leopardus tigrinus*.) 148f. **Tese (Doutorado em Ciências)** – Faculdade de Medicina veterinária e zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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

PENÁ, F.J.; SARAVIA, F.; GARCIA HERREROS, M.; NUNEZ-MARTINEZ, I.; TAPIA, J.A.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to post thaw quality. *Journal of Andrology*, 26, 716–723, 2005.

PETRUNKINA, A.M.; WABERSKI, D.; GÜNZEL-APEL, A.R.; TÖPFER-PETERSEN, E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 134, 3–17, 2007.

PLATZ, C.C.; SEAGER, S.W.J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 173, 1353-1355, 1978.

PONGLOWHAPAN, S.; CHATDARONG, K.; SIRIVAIYAPONG, S.; LOHACHIT, C. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. *Theriogenology*, 66, 1633-1636, 2006.

PRICE, L. J. Identifying cluster overlap with NORMIX population membership probabilities, *Multivariate Behavioral Research*, 28, 235-262, 1993.

PUKAZHENTHI, B.S.; PELICAN, K.; WILDT, D.E.; HOWARD, J.G. Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrossomal damage. *Biology of Reproduction*, 61, 135-41, 1999.

PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E.; HOWARD, J.G. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *Journal of reproduction and fertility supplement*, 57, 423-433, 2001.

QUINTAL, G. M. DA C. C. Análise de clusters aplicada ao Sucesso/Insucesso em Matemática. **Dissertação submetida com vista à obtenção do grau de mestre em matemática para o ensino**. Universidade da Madeira Departamento de Matemática e Engenharias. 184p. 2006.

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

QUINTERO-MORENO, A.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J. Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reproduction Domestic Animal*, 42, 312–319, 2007.

RAMÓN, M.; SOLER, A.J.; ORTIZ, J.A.; GARCÍA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; ROLDÁN, E.R.; GARDE, J.J. Sperm population structure and malefertility: an intraspecific study of sperm design and velocity in reddeer. *Biology of Reproduction*. 89, 110, 2013.

RIGLER, R.; RIGLER, P.; NILSSON, L. Method and device for measuring dynamic properties of particles. United States Patent and Trademark Office, 7, 912, 274 B2, 2011.

RIJSSELAERE, T.; SOOM, A.V.; MAES, D.; KRUIF, A. Effect of technical setting on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. **Theriogenology**, 60, 1553-1568, 2003.

SCHNITZER, J. DE F.; SOUZA, A.K.; MARTINS, M.I.M. Determinação da concentração espermática de gatos por meio da câmara de Neubauer versus CASA. **XXV Encontro Anual de Iniciação Científica – EAIC**, Universidade Estadual de Londrina, 2016.

SCOTT, P. Cats. In: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Hafez E. S. (ed), 205, **Lea and Febiger**, Philadelphia, 1970.

SHALGI, R., SMITH, T., YANAGIMACHI, R. A quantitative comparison of the passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction. *Biology of Reproduction*, 46, 419–424, 1992.

SANTOLARIA, P; VICENTE-FIEL, S.; PALACÍN, I.; FANTOVA, E.; BLASCO, M.E.; SILVESTRE, M.A.; YÁNIZ, J.L. Predictive capacity of sperm quality parameters and spermsubpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. **Animal Reproduction Science**, 163, 82–88, 2015.

SELYA, A.S.; ROSE, J.S.; DIERKER, L.C.; HEDEKER, D.; MERMELSTEIN, R.J. A practical guide to calculation Cohen's f^2 , a measure of local effect size, from PROC MIXED. **Frontiers in Psychology**, 3, 111, 2012.

SILVA, T.F.P. Avaliação andrológica, métodos de coleta e tecnologia do sêmen de gatos domésticos utilizando água de coco em pó (ACP-117®). 2008. 164f. **Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)** – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

SOUZA, D.B.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H. C.; MAIA, M.S. Ranqueamento/agrupamento do sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês analisadas pelo sistema casa e sondas fluorescentes pela análise estatística multivariada. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, 20, 4, 649-657, 2013.

SWANSON, W.F. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. **Theriogenology**, 66, 1, 49–58, 2006.

TEBET, J.M.; MARTINS, M.I.M.; CHIRINEA, V.H.; SOUZA, F.F.; CAMPAGNOL, D.; LOPES, M.D. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. **Theriogenology**, 66, 1629–1632, 2006.

THURSTON, L.M.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. **Journal Reproduction and Fertility**, 117, 271– 280, 1999.

TSUTSUI, T. Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). **Theriogenology**, 66, 122–125, 2006.

- TSUTSUI, T.; WADA, M.; ANZAI, M.; HORI, T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 65, 397-399, 2003.
- VALLE, R.R.; NAYUDUC, P.L.; LEALD, C.L.V.; GARCÍA-HERREROSD, M. Sperm head morphometry in ejaculates of adult marmosets (*Callithrix jacchus*): A model for studying sperm subpopulations and among-donor variations. **Theriogenology**, 78, 1152–1165, 2012.
- VAN DER H., G.; SEIER, J.V.; SPINKS, A.C. e HENDRICKS, S. 1999 The maturation of sperm motility in the epididymis and vas deferens of the vervet monkey, *Cercopithecus aethiops*. *International Journal of Andrology* 22 197–207.
- VÁZQUEZ, A.J.F.; CEDILLOA, M.J.; QUEZADAB, V.J.; RIVASB, A.C.; MORALESB, E.C.L.; AYALAC, E.M.E.; HERNÁNDEZB, M.J.; GONZÁLEZB, R.A.; ARAGÓNB, M.A. Effects of repeated electroejaculations on kinematic sperm subpopulations and quality markers of Mexican creole goats. **Animal Reproduction Science**, 154, 29–38, 2015.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, 57, 149-179, 2002.
- VICENTE-FIEL, S.; PALACÍN, I.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J.L. A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). **Animal Reproduction Science**, 139, 182– 189, 2013.
- VICINI, L. Análise multivariada da teoria à prática. (**Monografia de especialização**). Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, 215, 2005.
- VIEIRA, D.K.; SUZANO, S.M.; SILVEIRA, A.M.; PIRES, M.V.; LIBONATI, J.; FERREIRA, A.M.R. Avaliação clínica, citológica e seminal de gatos domésticos (*felis catus*) para seleção de reprodutores. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, 09, 09, 07 – 09, 2010.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, 60-61, 481-92, 2000.
- WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M. The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: International Conference on deep freezing boar semen, **Proceedings**, 1, 113 – 127, 1985.
- YÁNIZ, J.L., PALACÍN, I., VICENTE-FIEL, S., SÁNCHEZ-NADAL, J.A., SANTOLARIA, P. Sperm population structure in high and low field fertility rams. **Animal Reproduction Science**, 156, 128–134, 2015.
- YU, I.; LEIBO, S.P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. **Theriogenology**, 57, 1179-1190, 2002.
- ZAMBELLI, D.; CANEPPELE, B.; CATAGNETTI, C.; BELLUZZI, S. Cryopreservation of the cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. **Reproduction in Domestic Animals**, 37, 310-313, 2002.

ZAMBELLI D.; CUNTO M. Semen collection in cats: Techniques and analysis. **Theriogenology**, 66, 159–165, 2006.

3 HIPÓTESE

A refrigeração dos espermatozoides de felinos domésticos à -1°C é eficiente para a preservação espermática.

A refrigeração espermática modifica a proporção das subpopulações de espermatozoides de felinos domésticos colhidos pela técnica de eletroejaculação.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as subpopulações espermáticas de felinos domésticos utilizando estatística multivariada de espermatozoides colhidos por eletroejaculação e recuperação da cauda do epidídimo. Avaliar o efeito da refrigeração na distribuição de frequência de espermatozoides nas diferentes subpopulações.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1° Avaliar a qualidade espermática de felinos domésticos, obtidos por eletroejaculação e recuperação da cauda do epidídimo, e após a refrigeração a -1°C por 24 e 48 horas.

2° Identificar e comparar as subpopulações espermáticas de gatos domésticos colhidos por eletroejaculação, refrigerados a -1°C por 24 e 48 horas, e adicionalmente analisar a frequência de espermatozoides nas subpopulações determinadas.

5 ARTIGO I

EFEITO DA REFRIGERAÇÃO A -1°C SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA DE FELINOS DOMÉSTICOS

EFFECT OF REFRIGERATION AT -1 ° C ON THE SPERMAL QUALITY OF DOMESTIC CATS

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a qualidade espermática de felinos domésticos, obtidos por eletroejaculação e recuperação da cauda do epidídimo, e após a refrigeração a -1°C por 24 e 48 horas. Foram utilizados 29 gatos adultos (2 a 6 Kg). A colheita dos espermatozoides foi realizada por eletroejaculação (EEJ) e, após 48 horas, os gatos foram orquiectomizados e os espermatozoides obtidos do ducto deferente e da cauda do epidídimo (EPD). As amostras foram diluídas em meio ACP - 117® e a avaliação das características dos espermatozoides foram realizadas em três momentos: fresco, 24 e 48 horas após a refrigeração. O experimento foi realizado em duas etapas: no grupo A foram utilizados 14 gatos, e a refrigeração das amostras foram a -1°C e no grupo B foram utilizados 15 gatos, e os espermatozoides foram refrigerados a 4°C. A cinética espermática foi avaliada pela análise computadorizada (CASA), a concentração pela câmara de Neubauer, morfologia espermática pela coloração Karras modificado e a integridade de membrana pela eosina nigrosina. Os resultados obtidos foram analisados no Software R 3.2.5 utilizando o teste Mann Whitney para as variáveis com distribuição anormal e considerado nível de significância de 5%. No EEJ foi observado valores superiores de total de defeitos morfológicos após 24 e 48 horas de refrigeração a 4°C ($p < 0,022$) em comparação com a refrigeração a -1°C. Para evidenciar a queda na qualidade espermática, foi realizado o cálculo da redução dos parâmetros entre os momentos (F-24h/ F-48h/ 24h-48h). No EPD foi detectada maior redução da qualidade espermática após 24 horas de refrigeração a 4°C, tanto na motilidade como cinética espermática e índices de movimento e velocidade quando comparada à refrigeração a -1°C. Baseado nos resultados obtidos pode ser concluído que a refrigeração a -1°C de espermatozoides felinos por até 48 horas foi eficiente para manter a qualidade espermática colhida por EEJ e pela EPD, podendo ser uma nova alternativa à criopreservação espermática de felinos domésticos.

Palavras-chave: Criopreservação. Gatos. Água de Coco. Eletroejaculação. Epidídimo.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the sperm quality of domestic cats obtained by electroejaculation and recovery of the epididymal tail, and after cooling at -1°C for 24 and 48 hours. Twenty-nine adult cats (2 to 6 kg) were used. Sperm collection was performed by electroejaculation (EEJ) and, after 48 hours, the cats were orchietomized and the sperm obtained from the vas deferens and tail of the epididymis (EPD). The samples were diluted in ACP - 117[®] extender and the sperm characteristics were evaluated in three moments: fresh, 24 and 48 hours after cooling. The experiment was carried out in two stages: in group A, 14 cats were used, and the samples were refrigerated at -1°C and in group B 15 cats were used, and the spermatozoa were refrigerated at 4°C . Sperm kinetics were evaluated by computerized analysis (CASA), concentration by the Neubauer chamber, spermatid morphology by modified Karras staining, and membrane integrity by eosin nigrosine. The results obtained were analyzed in Software R 3.2.5 using the Mann Whitney test for variables with abnormal distribution and considered a significance level of 5%. In the EEJ, higher values of total morphological defects were observed after 24 and 48 hours of refrigeration at 4°C ($p < 0.022$) compared to refrigeration at -1°C . In order to show the decrease in sperm quality, the calculation of the reduction of the parameters between the moments (F-24h / F-48h / 24h-48h) was performed. In the EPD, a greater reduction in sperm quality was detected after 24 hours of refrigeration at 4°C , both in motility and sperm kinetics and in movement and speed indexes when compared to refrigeration at -1°C . Based on the results obtained, it can be concluded that the cooling at -1°C of feline spermatozoa for up to 48 hours was efficient to maintain the spermatid quality collected by EEJ and EPD, and could be a new alternative to the sperm cryopreservation of domestic felines.

Keywords: Cryopreservation. Cats. Coconut water. Electroejaculation. Epididymis.

Introdução

A sobrevivência e manutenção das espécies são facilitadas pela reprodução assistida, entretanto ainda há dificuldades na preservação do material genético. Uma das mais importantes ferramentas desenvolvidas foi a criopreservação de gametas (FARSTAD, 2000), que possibilitou a conservação do material genético de espécies domésticas e selvagens, inclusive as ameaçadas de extinção.

O gato doméstico é o modelo experimental para as espécies felinas selvagens, portanto a compreensão da fisiologia reprodutiva e de fatores que interferem na espermatogênese e viabilidade espermática se faz necessária para a utilização de biotécnicas reprodutivas em felídeos, como por exemplo, o estudo das condições de criopreservação espermática (BRONSON, 1985; MEYER, 2013; MARTINS et al., 2014; MARTINS; JUSTINO, 2015).

A viabilidade de espermatozoides criopreservados é afetada por vários fatores, como a composição e concentração do diluente, a temperatura e velocidade dos processos de refrigeração e principalmente pela qualidade espermática a fresco. Embora tenham sido obtidos resultados promissores com sêmen refrigerado de felinos, não há uma definição da temperatura de refrigeração com altas taxas de sucesso (LUVONI et al., 2003). Há evidências de que grande parte dos espermatozoides que passam pelo processo de criopreservação adquire lesão acrossomal, comprometendo a capacidade de fertilização (TEBET et al., 2006). Portanto, estudos sobre a criopreservação são necessários para obter espermatozoides viáveis que possam ser empregados em biotecnologia.

A maioria dos estudos comparou a qualidade dos espermatozoides refrigerados a 4-5°C, com a de congelados a -196°C (CHATDARONG et al., 2006, 2009; GAÑÁN et al., 2009). No conhecimento dos autores, apenas um trabalho de inseminação artificial em gatos (TSUTSUI, 2006) relata a utilização do sêmen a uma temperatura de refrigeração mais baixa, a 0°C, na qual foi obtido taxa de concepção de 57%. Segundo Nunes (2008; 2010), é

recomendável a refrigeração lenta a 4°C para evitar o choque térmico e perda irreversível das células espermáticas, embora os estudos não demonstrem o comportamento das células espermáticas de felinos em diferentes temperaturas de refrigeração.

Garcia-Olivares et al. (2016) realizaram um estudo com refrigeração de espermatozoide de suínos, comparando temperaturas abaixo de zero (-3°C, -5°C, -7°C), e constataram que temperaturas negativas permitiram que a membrana plasmática do espermatozoide se adapte melhor às alterações na fluidez sem perda de permeabilidade seletiva, melhorando a qualidade das células. Partindo do pressuposto que as características fisiológicas dos espermatozoides são espécie-específicos, se faz necessário o estudo de metodologias de refrigeração para o sêmen de felinos, cujas células são mais resistentes a baixas temperaturas comparadas a outras espécies, e quando armazenados em diluente de qualidade, podem manter sua qualidade ao longo de três semanas (HARRIS et al., 2001; CHATDARONG et al., 2009).

Para a preservação dos espermatozoides à criopreservação, diluentes alternativos, como a água de coco, vêm alcançando resultados promissores, tanto por ser uma solução estéril, natural como por apresentar longevidade na forma de pó (BARROS; TONIOLLI, 2011). Tem sido utilizada de forma padronizada (ACP- 117® -Biotecnologia, Fortaleza, Brasil), ficando livre da variabilidade de origem biológica e tem como vantagem a facilidade no transporte do sêmen por não conter ovo na sua composição, reduzindo as barreiras sanitárias.

Considerando que estudos avaliando o melhor tempo de refrigeração para espermatozoides de felinos ainda são escassos, o objetivo desse trabalho foi avaliar a qualidade espermática de felinos domésticos, obtidos por eletroejaculação e recuperação da cauda do epidídimo, e após a refrigeração a -1°C por 24 e 48 horas.

Material e Métodos

Aspectos éticos e locais

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais Institucional - CEUA de número 7099.2015.53.

Animais

Foram utilizados vinte e nove (29) gatos domésticos adultos, sem raça definida, semidomiciliados, em bom estado nutricional, pesando de 2 a 6 Kg, clinicamente saudável, no período de novembro de 2015 a fevereiro de 2016.

Delineamento Experimental

A colheita dos espermatozoides foi realizada por duas técnicas. Inicialmente os animais foram submetidos à eletroejaculação e, 48 horas após, foi realizada orquiectomia eletiva e os espermatozoides foram recuperados da cauda do epidídimo. As amostras foram diluídas em meio ACP - 117® e a avaliação das características espermáticas foram realizadas em três momentos: a fresco, após 24 horas e 48 horas de refrigeração.

Em vista do reduzido volume espermático dos gatos, o experimento foi realizado em duas etapas: na primeira (Grupo A) foram utilizados 14 gatos, e a refrigeração espermática foi a -1° C. A segunda (Grupo B) foram utilizados 15 gatos, e os espermatozoides foram refrigerados a 4° C.

Colheita do Material

Eletroejaculação

Para a EEJ foi utilizado o protocolo anestésico com cetamina (12 mg/Kg - Dopalen®, Ceva, Brasil) associado a medetomidina (30µg/Kg - Dormitor®, Pfizer, França). Após a

anestesia geral realizou-se a exposição peniana e cateterização uretral com cateter 24G acoplado a um microtubo de polipropileno de 1,5 mL.

Os estímulos elétricos foram produzidos por uma sonda transretal, com dois eletrodos longitudinais (0,9 cm de diâmetro e 11 cm de comprimento), posicionados acima da próstata. O protocolo da eletroejaculação foi realizado conforme descrito por Howard et al. (1990).

Recuperação de Espermatozoides da Cauda do Epidídimo

Os animais foram submetidos à orquiectomia eletiva. Imediatamente após o procedimento o ducto deferente foi ligado e os conjuntos, testículos e epidídimos, foram conduzidos ao laboratório. A vascularização da cauda do epidídimo e do ducto deferente foi isolada, e com auxílio de uma pinça hemostática foi realizada a compressão para a obtenção do fluido epididimário em uma placa de Petri, contendo 100 µL de solução de NaCl 0,9% para cada epidídimo, totalizando um volume de 200 µL por animal.

Processamento dos Espermatozoides

Os espermatozoides foram analisados a fresco e após a refrigeração por 24 e 48 horas, quanto a cinética do movimento por análise computadorizada (CASA), concentração em câmara de Neubauer, morfologia espermática pela coloração Karras modificado (PAPA et al., 1988) e a integridade da membrana e viabilidade, pela coloração eosina nigrosina. Após a análise a fresco, a amostra foi centrifugada a 300g durante 10 minutos (Microcentrífuga MiniSpin Plus® – Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso com o diluente ACP- 117® (pH 7,43; 297 mOsm/ Kg H₂O; PL= 3,43g), preparado conforme recomendações do fabricante, na concentração final de 40 x 10⁶ espermatozoides/mL. As amostras foram aliqüotadas em tubos de 1,5 mL, os quais foram acondicionados, em um recipiente plástico contendo 200 mL de água na temperatura

ambiente, de forma que o conteúdo dos tubos ficasse submerso e submetidos à refrigeração à -1°C (Grupo A) ou a 4°C (Grupo B).

Análise Espermática Computadorizada

A avaliação espermática foi realizada em três momentos (fresco, 24 e 48h). Os parâmetros de cinética espermática foram analisados pelo sistema CASA (HTR-IVOS, version 14.0), conforme *setup* de felinos (Quadro 1). Foram obtidos os valores de motilidade total (% - MT); motilidade progressiva (% - MP); velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$ - VAP); velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$ - VSL); velocidade curvilinear ($\mu\text{m/s}$ - VCL); amplitude lateral da cabeça (μm - ALH); retilinearidade (% - STR) e linearidade (% - LIN).

Posteriormente, foram calculados os índices de movimento (SMI) e de velocidade (SVI), de acordo com Agarwal et al. (2003) modificado por Núñez-Martinez et al. (2006): $\text{SMI} = (\text{VSL} \times 0,59) + (\text{VAP} \times 0,37) + (\text{LIN} \times 0,95) + (\text{STR} \times 0,89) + (\text{WOB} \times 0,83)$ e $\text{SVI} = (\text{VCL} \times 0,87) + (\text{VSL} \times 0,76) + (\text{VAP} \times 0,90) + (\text{ALH} \times 0,92)$. A oscilação do movimento espermático (WOB) foi calculada pela fórmula $\text{VAP/VCL} \times 100$.

Concentração pela Câmara de Neubauer

Foi utilizada a diluição 1:200 da amostra de sêmen em água destilada e leitura em câmara de Neubauer, em microscópio óptico de contraste de fase no aumento de 200x. O resultado foi expresso em número de espermatozoides/mL.

Morfologia espermática - Karras Modificado

Para avaliação da morfologia espermática foram realizados esfregaços das amostras espermáticas em lâminas de vidro e coradas com Karras modificado (PAPA et al., 1988). Foram avaliadas 100 células espermáticas utilizando microscópio óptico em aumento de

1000x. As alterações morfológicas foram classificadas em defeitos maiores e menores, divididos em defeitos de cabeça, peça intermediária, cauda e acrossoma. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Integridade de Membrana – Eosina Nigrosina

Para avaliação da integridade da membrana foram realizados esfregaços com 3 μL da amostra acrescida de 3 μL do corante eosina nigrosina. Foram contadas 100 células por lâmina, sob microscopia de luz (1.000). As células espermáticas foram classificadas em membrana íntegra, quando translúcidas, ou lesadas, quando possuíam a cabeça com a coloração rósea. Os resultados foram expressos em porcentagem de espermatozoides.

4.7. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados no Software R 3.2.5. Foi realizado o testes não paramétrico de Friedman para comparar o grupo refrigerado a -1°C e a 4°C . O nível de significância considerado foi de 5%.

Resultados

O volume do ejaculado obtido foi em média 50 μL (variando entre 10 e 90 μL), enquanto que o volume para a EPD foi pré-determinado em 200 μL .

Após a refrigeração a -1 e a 4°C , tanto nos espermatozoides provenientes do ejaculado como do epidídimo, os parâmetros cinéticos avaliados apresentaram uma tendência em diminuir, ou seja, houve uma diminuição numérica, mas não estatística na qualidade do movimento (Tabela 1 e 2). Na EEJ, foi observada diferença na porcentagem de células normais ($p<0,026$), nos defeitos maiores ($p<0,022$) e totais de defeitos ($p<0,026$) após 24 e 48 horas de refrigeração, sendo que o aumento de defeitos espermáticos totais foi superior no

grupo refrigerado a 4°C. Com a finalidade de evidenciar a queda na qualidade espermática, foi realizado o cálculo da redução dos parâmetros entre os momentos (F-24h/ F-48h/ 24h-48h) nas duas temperaturas de refrigeração (Tabela 3 e 4). No grupo EEJ, a porcentagem de defeitos menores mostrou redução mais acentuada no grupo refrigerado a 4°C. Já o grupo do EPD, os parâmetros de MT, MP, as velocidades, ALH, SVI e SMI entre fresco e 24 horas, a redução da qualidade espermática foi superior no grupo refrigerado a 4°C em todos os parâmetros.

Discussão

Os resultados das avaliações dos parâmetros cinéticos após a refrigeração, por até 48 horas, de espermatozoides felinos a -1°C ou 4°C sugerem que a viabilidade espermática não foi diferente, embora vários autores tenham utilizado a refrigeração a 4°C (PUKAZHENTHI et al., 1999; ZAMBELLI et al, 2002; TEBET et al, 2006; NUNES, 2008; 2010). Na avaliação da morfologia espermática, foi detectada maior porcentagem de defeitos espermáticos totais no grupo refrigerado a 4°C ($p < 0,026$), evidenciando que a temperatura a -1°C causou menor criolesão ao ejaculado.

Os resultados da porcentagem de redução dos parâmetros permitem evidenciar queda da qualidade nas duas temperaturas, e foi constatado que houve uma redução significativa ao comparar as amostras a fresco/24 horas e a fresco/48 horas de refrigeração, mas não houve diferença entre 24/48 horas de refrigeração, sugerindo estabilização das células a baixa temperatura após as primeiras horas de refrigeração. Resultados similares foram obtidos por Villa Verde et al. (2006), quando observaram queda importante na motilidade e motilidade progressiva 24 horas após refrigeração, induzida pela baixa temperatura, provavelmente, devido a danos no acrossoma.

Os SVI e SMI apresentaram maior redução nos espermatozoides refrigerados a 4°C. Considerando que, os melhores resultados na criopreservação, estão relacionados com maiores índices de movimento e de velocidade, pois representam o *status* biológico dos espermatozoides (NÚÑEZ-MARTÍNEZ, 2006), pode-se inferir que os resultados obtidos da viabilidade espermática dos espermatozoides colhidos do EPD e refrigerados a 4°C, poderiam comprometer os resultados da cinética espermática nas biotécnicas da reprodução em felinos.

Os espermatozoides refrigerados a -1°C apresentaram resultados aceitáveis aos padrões do CBRA (2013) tanto na cinética espermática como na porcentagem de células normais, demonstrando qualidade superior aos parâmetros analisados. Os espermatozoides epididimários sofreram uma maior redução do que os do ejaculado, em vistas das células do EPD terem sido recuperados em solução fisiológica, apresentando inicialmente uma qualidade espermática inferior. É necessário que haja um período para o equilíbrio da solução, e embora não tenha alterado o pH e a pressão osmótica, não observando grandes alterações da membrana, a solução diminui a motilidade de forma não deletéria, sendo que após a adição do diluente as células se estabilizam.

Acredita-se que os resultados superiores obtidos na refrigeração a -1°C são decorrentes das características fisiológicas dos espermatozoides de felinos, os quais a membrana plasmática se adapta melhor, e proporciona fluidez da membrana em temperaturas mais baixas (GARCIA-OLIVARES et al. (2016), visto que durante a criopreservação, a membrana plasmática do espermatozoide sofre uma série de mudanças relacionadas às alterações de temperatura, se modificando progressivamente da fase líquida cristalina, para a fase de gel, aumentando a proteção da célula (HAZEL et al., 1995).

Os resultados superiores obtidos na refrigeração a -1°C sugerem que os espermatozoides de felinos podem ser resistentes as temperaturas mais baixas. Esta resistência das células espermáticas ao estresse térmico pode ser atribuída a menores danos dos

espermatozoides de gatos domésticos, assim como identificados em cães, provavelmente ocasionado pela baixa proporção de ácidos graxos fosfolípidos poliinsaturados e saturados (WHITE et al., 1993; RODENAS et al., 2014). Temperaturas mais baixas de refrigeração reduzem o metabolismo das células, chegando próximas ao basal, permitindo uma maior sobrevivência das células mais resistentes ao frio. Além disso, podemos considerar que o diluente utilizado causou a estabilização da membrana durante a refrigeração reduzindo os danos que resultam do choque frio.

Sendo a eletroejaculação a técnica mais comum na colheita de sêmen de felinos, para a refrigeração espermática, o presente estudo demonstrou que o uso do ACP- 117® manteve a viabilidade dos espermatozoides obtidos pela EEJ e submetidos a refrigeração, de forma semelhante as células do EPD. Apresentando-se como mais uma alternativa de baixo custo e fácil obtenção, para a refrigeração do sêmen de felinos, uma vez que o diluente a base de água de coco, até o presente momento, só havia sido descrito para a preservação de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo e colhidos com vagina artificial (LIMA, 2014, 2016; SILVA, 2008).

A refrigeração dos espermatozoides de EEJ a temperatura de -1°C provocou menor criolesão, principalmente no total de defeitos morfológicos, possibilitou menor queda da qualidade espermática após 48 horas de refrigeração, diferente do que está disponível na literatura que determina 4°C como a temperatura ideal para a refrigeração espermática (GOODROWE et al., 1993; PUKAZHENTHI et al., 1999; HARRIS et al, 2001).

Conclusão

A refrigeração a -1°C de espermatozoides felinos por até 48 horas foi eficiente para manter a qualidade das células espermáticas colhida por EEJ e do EPD, podendo ser uma nova alternativa à criopreservação espermática de felinos domésticos.

Referências

- AGARWAL, A.; SHARMA, R.K.; NELSON, D.R. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. **Journal of Andrology**, 24, 343–52, 2003.
- BARROS, T. B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 35, 4, 400-407, 2011.
- BRONSON, F.H. Mammalian reproduction: an ecological perspective. **Biology of Reproduction**, 32, 1, 1-26, 1985.
- CHATDARONG, K.; BOONYEN, T.; RUNGSUK, K.; CHOWTRAKUL, C.; LOHACHIT, C. Freezing of cat epididymal spermatozoa after cold storage. **Chulalongkorn University Faculty of Veterinary Science**, Bangkok, Thailand, 26-29, 2006.
- CHATDARONG, K.; THUWANUT, P.; SUKSAMAI, P.; PATANATIRADAJ, S. e SANGWORNACHASUP, A. Survival of Frozen-Thawed Cat Spermatozoa Pre-Cooled in the Epididymides. **Reproduction of Domestic Animals**, 44, 2, 377–380, 2009.
- FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, 60–61, 375–387, 2000.
- GAÑÁN, N.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E.R.S. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5°C on sperm quality and cryopreservation. **Theriogenology**, 72, 1268–1277, 2009.
- GARCIA-OLIVARES, A.; GARZON-PEREZ, C.; GUTIERREZ-PEREZ, O.; MEDRANO, A. Effect of cooling to different sub-zero temperatures on boar sperm cryosurvival. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, 5, 1, 63–66, 2016.
- GOODROWE, K.L.; HAY, M. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, 40:967–75, 1993.
- HARRIS, R.F.; POPE, C.E.; GOMEZ, M.C.; LEIBO, S.P.; DRESSER, B.L. Storage of domestic cat spermatozoa for extended periods at 4 8C. **Theriogenology**, 55, 308, 2001 [Abstract].
- HAZEL, J.R. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? **Annual Review of Physiology**, 57, 19-42, 1995.
- HOWARD, J.G.; BROWN, J.L.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Teratospermic and Normospermic Domestic Cats: Ejaculate Traits, Pituitary-Gonadal Hormones, and Improvement of Spermatozoal Motility and Morphology After Swim-Up Processing. **Journal of Andrology**, 11, 3, 1990.
- LIMA, D.B.C; SILVA, T.F.P.; AQUINO-CORTEZ, A.; PINTO, J.N.; CALDINI, B.N.; MAGALHÃES, F.F.; SILVA, L.D.M. Avaliação de espermatozoides epididimários de gatos

domésticos após recuperação com ACP-117c ou TRIS, adição de gema e refrigeração a 4 °C por 24h. **Ciência Animal**, 24, 03-10, 2014.

LIMA, D.B.C.; SILVA, T.F.P.; AQUINO-CORTEZ, A.; PINTO, J.N.; MAGALHÃES, F.F.; CALDINI, B.N.; SILVA, L.D.M. Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and Tris extenders. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, 68, 4, 873-881, 2016.

LUVONI, G.C.; KALCHSCHMIDT, E.; LEONI, S.; RUGGIERO, C. Review Conservation of feline semen Part I: Cooling and freezing protocols. **Journal of Feline Medicine and Surgery** 5, 203–208, 2003.

MARTINS, M.I.M.; JUSTINO, R.C. Criopreservação espermática em felinos: estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 39, 1, 136-140, 2015.

MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; ACKERMANN, C.L. Biotecnias do sêmen. In: VICENTE, W.R.R.; APPARICIO, M. **Reprodução e obstetrícia em cães e gatos**. 1ed. Curitiba: Editora MEDVET Ltda, 339-362, 2014.

MEYER K.B. Função testicular em gatos domésticos (*Felis catus*): atividade da enzima aromatase e aspectos sazonais da esteroidogênese e espermatogênese. **Dissertação de Mestre em Fisiologia**, ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2013.

NUNES, D.B.; ZORZATTO, J.R.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. **Animal Reproduction Science**, 104, 434-439, 2008.

NUNES, J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução de pequenos ruminantes. Fortaleza: **Tecnograf**, 208, 2010.

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

PAPA, F.O.; BICUDO, S.D.; ALVARENGA, M.A.; RAMIRES, P.R.N.; CARVALHO, I.M.; LOPES, M.D. Coloração espermática segundo KARRAS, modificada pelo emprego de barbatimão (*Stryphnodendrum barbatimam*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 40, 115-23, 1988.

PUKAZHENTHI, B.; PELICAN, K.; WILDT, D.; HOWARD, J.G. Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. **Biology of Reproduction**, 61, 135–141, 1999.

RODENAS, C.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A.; LUCAS, X. Effects of Rapid Cooling Prior to Freezing on the Quality of Canine Cryopreserved Spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, 60, 5, 2014.

SILVA, T.F.P. Avaliação andrológica, métodos de coleta e tecnologia do sêmen de gatos domésticos utilizando água de coco em pó (ACP-117®). 2008. 164f. **Tese (Doutorado em**

Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

TEBET, J.M.; MARTINS, M.I.M.; CHIRINEA, V.H.; SOUZA, F.F.; CAMPAGNOL, D.; LOPES, M.D. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. **Theriogenology**, 66, 1629–1632, 2006.

TSUTSUI T. Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). **Theriogenology**, 66 122–125, 2006.

VILLAVERDE, A.I.S.B.; MARTINS, M.I.M.; CASTRO, V.B.; LOPES, M.D. Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*). **Theriogenology**, 66, 1641–1644, 2006.

WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction Fertility Development**, 5, 639–658, 1993.

Quadro 1 – *Setup* utilizado no HTR-IVOS 14.0 para avaliação dos espermatozoides de felinos

Parâmetros	Valores
Tipo de Câmara	Cell-Vu®
Temperatura da Análise (°C)	37
Campos adquiridos	30
Quadros (Hz)	60
Número de quadros	5
Contraste estático mínimo	40
Tamanho mínimo da célula (pixels)	4
Retiliniaridade (STR), limiares (%)	80
VAP cut-off ($\mu\text{m/s}$)	30
Mínimo progressivo VAP ($\mu\text{m/s}$)	70
VSL cut-off ($\mu\text{m/s}$)	20
Intensidade da célula	50
Magnificação	1,89

Tabela 1 - Resultados da mediana (mínimo-máximo) das análises microscópicas de espermatozoides de felinos domésticos, colhidos por eletroejaculação (EEJ), nas avaliações a fresco e após a refrigeração a -1°C e a 4°C por 24 horas e 48 horas.

Características espermáticas	ELETROEJACULAÇÃO					
	Refrigeração a -1°C			Refrigeração a 4°C		
	Fresco	24 h	48h	Fresco	24 h	48h
MT (%)	77,5 (50 - 91)	46 (10 - 75)	43,5 (4 - 64)	61,5 (34 - 72)	17 (8 - 40)	17 (6 - 20)
MP (%)	49,5 (27 - 75)	26 (2 - 56)	14,5 (1 - 36)	34,5 (16 - 44)	8,5 (5 - 21)	4,5 (2 - 8)
VAP (µm/s)	160,6 (109,8 - 185,2)	106,6 (60,1 - 115,1)	67,10 (60,1 - 109,6)	121,3 (99,8 - 148,7)	98,3 (82,7 - 126)	70,7 (56,9 - 100,4)
VSL (µm/s)	140,5 (81,1 - 171,8)	91,95 (52,7 - 99,3)	54,5 (49,4 - 91,6)	104,8 (82,2 - 123)	89 (68,8 - 101,5)	59,2 (50,1 - 73,1)
VCL (µm/s)	208,5 (178 - 234,7)	167,5 (115,2 - 189,3)	133,4 (107,9 - 175,3)	186,3 (16,5 - 203,9)	151 (137,9 - 205,3)	128,3 (100,9 - 184,9)
ALH (µm)	5,9 (5,5 - 7,6)	5,3 (4,5 - 6,8)	5,6 (4,2 - 6,1)	6 (5,6 - 6,4)	5,2 (2,7 - 5,9)	4,8 (4,2 - 5,4)
BCF (Hz)	33,8 (26,9 - 40,6)	40,2 (36,4 - 46,7)	37,2 (31,4 - 42,9)	37,4 (26,7 - 40,2)	42,1 (37,7 - 47,4)	38,9 (37,1 - 41,1)
STR (%)	86 (72 - 91)	84,5 (81 - 90)	82,5 (75 - 87)	82 (79 - 86)	84,5 (80 - 91)	82,5 (73 - 88)
LIN (%)	66 (39 - 72)	51 (43 - 61)	45 (37 - 53)	56 (50 - 58)	57,5 (43 - 68)	48,5 (41 - 53)
Area	6,5 (6 - 7,6)	46 (10 - 75)	43,5 (4 - 64)	6,9 (6,5 - 8,2)	17 (8 - 40)	17 (6 - 20)
WOB	76,1 (52,7 - 80,7)	59,7 (52,1 - 66,4)	53,1 (48,2 - 62,5)	61,5 (34 - 72)	65,8 (51,3 - 70,7)	55,1 (54,2 - 56,3)
SVI	436,2 (342,3 - 506,8)	315,4 (198,5 - 337,6)	222,7 (194 - 325,5)	357,9 (302,2 - 407,8)	280,8 (272,1 - 374,5)	224,7 (181,2 - 311,4)
SMI	344,3 (233,3 - 384,7)	267,1 (217,7 - 289,1)	222,5 (198,1 - 270,7)	288,8 (254,7 - 314,4)	280,3 (227,6 - 295)	226,3 (226 - 229,2)
Morfologia						
Normais	63,5 (38 - 92)	58 (29 - 84)*	59 (20 - 65)*	30 (14 - 55)	26,5 (13 - 37)*	28 (7 - 36)*
Defeitos Maiores	17,5 (4 - 32)	16 (9 - 45)*	19 (12 - 41)	55,5 (22 - 72)	52,5 (36 - 65)*	46,5 (37 - 77)
Defeitos Menores	18 (4 - 37)	17 (7 - 31)	20 (17 - 39)	19 (4 - 24)	22 (14 - 33)	22 (16 - 34)
Total Defeitos	36,5 (8 - 62)	42 (16 - 71)*	41 (35 - 80)*	70 (45 - 86)	73,5 (63 - 87)*	72 (64 - 93)*
Integridade de Membrana						
Lesados	10 (5 - 25)	15 (11 - 29)	17 (14 - 30)	8 (3 - 16)	8 (5 - 16)	5 (3 - 18)

(*) Diferença significativa entre as colunas correspondentes (p<0,05)

Tabela 2 - Resultados da mediana (mínimo-máximo) das análises microscópicas de espermatozoides de felinos domésticos, colhidos por recuperados da cauda do epidídimo (EPD), nas avaliações a fresco e após a refrigeração a -1°C e a 4°C por 24 horas e 48 horas.

Características espermáticas	EPIDÍDIMO					
	Refrigeração a -1°C			Refrigeração a 4°C		
	Fresco	24 h	48 h	Fresco	24 h	48 h
MT (%)	66 (32 - 92)	44 (7 - 77)	24 (6 - 68)	71 (46 - 92)	23 (2 - 68)	10 (0 - 61)
MP (%)	29,5 (6 - 60)	17,5 (0 - 37)	5 (34 - 0)	38 (22 - 59)	8 (1 - 41)	2 (0 - 39)
VAP (µm/s)	96,7 (68,6 - 152)	95,1 (60,2 - 126,4)	83,7 (53,8 - 163,6)	142,4 (109,5 - 170,3)	101,1 (61,4 - 151,4)	76,4 (0 - 132,4)
VSL (µm/s)	78,3 (52,4 - 124,2)	71,9 (44,3 - 106,4)	59 (40,3 - 136,4)	120,1 (89 - 144,5)	76 (46,4 - 127,6)	60,6 (0 - 112,5)
VCL (µm/s)	160,7 (125,1 - 222,2)	176,2 (111,1 - 204,6)	166,7 (108,2 - 217,5)	217,1 (171,1 - 253,8)	162,1 (106,4 - 193,6)	148,7 (0 - 191,6)
ALH (µm)	6,6 (5,6 - 7,5)	6,1 (0 - 7,3)	5,7 (0 - 7,3)	6,7 (5,6 - 7,7)	4,8 (3,4 - 6,5)	4 (0 - 7,2)
BCF (Hz)	33,9 (31 - 41,3)	37,5 (23,9 - 41,2)	35,4 (27,6 - 41,1)	32,5 (21,8 - 39,7)	38 (28,9 - 50,3)	30,8 (0 - 41,2)
STR (%)	77,5 (74 - 88)	77,5 (63 - 90)	78,5 (63 - 89)	80 (76 - 87)	83 (68 - 92)	77 (0 - 95)
LIN (%)	45 (38 - 60)	44 (33 - 56)*	42 (28 - 61)	55 (45 - 66)	56 (36 - 71)*	44 (0 - 75)
Area	7 (5,5 - 10,7)	6 (4,4 - 6,7)	5,4 (4,7 - 6,3)	6,3 (5,2 - 7,9)	5,1 (4,4 - 6,8)	5 (0 - 6,5)
WOB	55,5 (50,9 - 69,7)	54,8 (44,1 - 65,8)	50,5 (41,7 - 75,2)	67,3 (58,1 - 79,3)	62,8 (46,1 - 85,1)	68,1 (39,2 - 85,5)
SVI	296 (216,9 - 426,1)	299,1 (198,3 - 368,3)	277,3 (178,6 - 445)	402,7 (325,4 - 482,7)	296,4 (198,9-392,2)	288 (97,2 - 346,4)
SMI	246,7 (204,4 - 313,6)	232 (182,2 - 290,9)	211,7 (171,3 - 333,4)	312,9 (258,8 - 350,9)	246,4 (185,4-343,3)	236,7 (170,6 - 332,7)
Morfologia						
Normais	58,5 (16 - 84)	38,5 (9 - 81)	28,5 (5 - 78)	55 (36 - 73)	46 (14 - 66)	46 (12 - 71)
Defeitos Maiores	12 (0 - 36)	25,5 (8 - 63)	37,5 (10 - 82)	25 (9 - 48)	29 (13 - 60)	24 (7 - 60)
Defeitos Menores	40,5 (5 - 60)	22 (10 - 71)	29 (10 - 56)	18 (9 - 29)	25 (17 - 44)	28 (12 - 53)
Total Defeitos	46,5 (6 - 84)	61,5 (19 - 91)	71,5 (22 - 95)	45 (27 - 64)	54 (34 - 86)	54 (29 - 88)
Integridade de Membrana						
Lesados	6,5 (3 - 13)	7,5 (3 - 24)	9,5 (4 - 19)	4 (1 - 13)	8 (1 - 21)	12 (1 - 30)

(*) Diferença significativa entre as colunas correspondentes (p<0,05)

Tabela 3 - Porcentagem da redução das medianas (mínimo-máximo) dos valores entre o momento a fresco, 24 e 48 horas de refrigeração de espermatozoides colhidos por eletroejaculação (EEJ) de felinos domésticos.

Características Espermáticas	Refrigeração a -1°C			Refrigeração a 4°C		
	F - 24h	F - 48h	24h - 48h	F - 24h	F - 48h	24h - 48h
MT (%)	29,5 (7 - 56)	24,5 (14 - 62)	4,5 (-23 - 25)	31,5 (26 - 58)	44 (28 - 53)	3,5 (-5 - 20)
MP (%)	23,5 (-3 - 50)	36 (-1 - 59)	35 (-1 - 30)	23,5 (11 - 28)	30,0 (14 - 36)	20 (3 - 13)
VAP (µm/s)	61,6 (0,4 - 92,5)	75,9 (15,9 - 119,5)	20,2 (-7,6 - 46,6)	17 (2,3 - 49,6)	38,8 (28,9 - 91,8)	26,4 (11,4 - 42,2)
VSL (µm/s)	55,7 (3,6 - 81,1)	68,1 (3,6 - 115,9)	20,5 (-7,3 - 46,9)	19,7 (-3,6 - 30,8)	38,6 (23,1 - 72,9)	27,5 (9,4 - 42,1)
VCL (µm/s)	41 (2,2 - 88,1)	68,1 (33 - 109,9)	24 (10,5 - 53,9)	4,7 (-121,4 - 59,8)	31 (-112 - 99,8)	26,6 (9,4 - 40)
ALH (µm)	1 (-0,6 - 1,4)	0,6 (-0,10 - 1,5)	-0,3 (-1,5 - 1,4)	1 (0,1 - 2,9)	1,4 (0,2 - 1,9)	0,5 (-2,7 - 1,5)
BCF (Hz)	-6,2 (-15,1 - -1)	-1,5 (-16 - 3,4)	2,9 (-4,3 - 15,3)	-6,6 (-11,0 - -3,3)	-0,35 (-14,4 - 0,9)	4,3 (-3,4 - 8,1)
STR (%)	1 (-9 - 4)	4 (-10 - 13)	3 (-1 - 9)	-1,5 (-12 - 4)	1 (-9 - 10)	3,5 (0 - 7)
LIN (%)	13 (-4 - 20)	18 (-6 - 27)	4 (-5,0 - 18)	-3,5 (-14 - 15)	7,5 (1 - 13)	12,5 (-5 - 15)
AREA	0,9 (-0,3 - 1,2)	0,4 (-1,3 - 2,1)	-0,6 (-1,7 - 1,3)	1,4 (1,1 - 3,2)	1,65 (1,2 - 3,2)	0,05 (-0,1 - 0,6)
WOB	15,1 (-0,6 - 22,9)	18 (-0,8 - 28,2)	4,6 (-5,9 - 17,2)	2,9 (-10,7 - 14,6)	9,7 (5,3 - 17,6)	10,5 (-4,2 - 16)
SVI	127 (5,7 - 222,8)	180,98 (47,1 - 291,5)	54,2 (21,4 - 121,6)	43,7 (8,6 - 121,5)	92,6 (71,7 - 226,5)	58,8 (47,4 - 105)
SMI	89,1 (3,6 - 119,8)	101,8 (-7,3 - 165,3)	28,2 (-10,9 - 84,3)	16,4 (-28,8 - 59,4)	61,1 (28,1 - 88,4)	52,4 (1,46 - 68,9)
Morfologia						
Normais	11,5 (-5 - 55)	20,5 (-3 - 55)	5,5 (-1 - 20)	1,5 (-1 - 24)	3,5 (-5 - 28)	2,5 (-7 - 6)
Defeitos maiores	- 5 (-20 - 27)	-7 (-16 - 27)	-0,5 (-10 - 4)	-1,5 (-14 - 16)	-5 (-27 - 35)	-3,5 (-13 - 19)
Defeitos menores	3,5 (-13 - 18)	-6,5 (-16 - 18)	-5 (-13 - 2)*	-4,5 (-18 - 2)	-3,5 (-28 - 5)	-49,5 (-71 - -40)*
Total de defeitos	-11,5 (-55 - 5)	-20,5 (-55 - 3)	-5,5 (-20 - 1)	-1,5 (-24 - 1)	43 (21 - 70)	-2,5 (-6 - 7)
Integridade de Membrana						
Lesados	-4 (-14 - 15)	-6,5 (-12 - 15)	-2 (-6 - 7)	0,5 (-13 - 10)	4,5 (-15 - 10)	1 (-2 - 6)

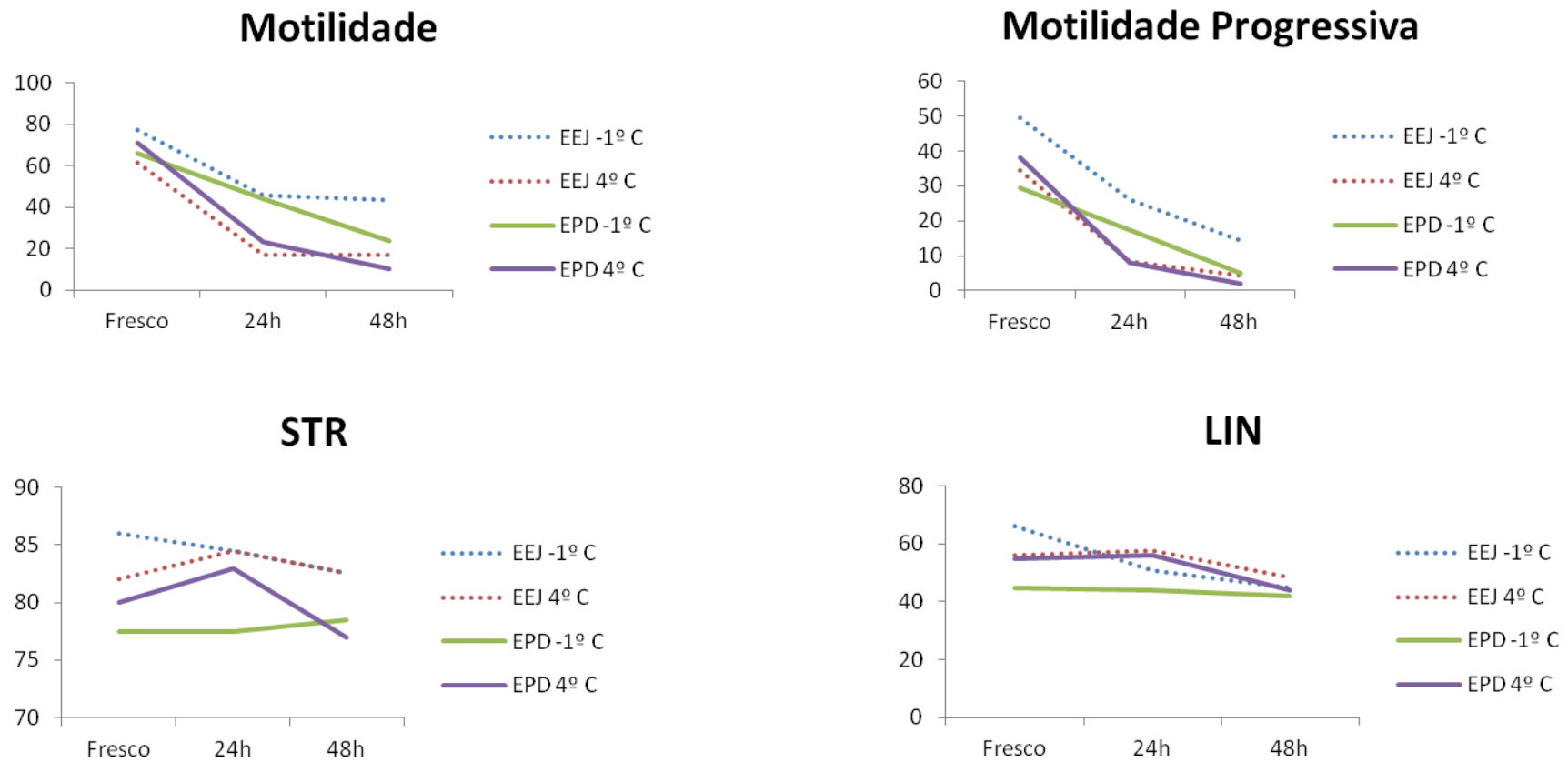
(* Diferença significativa entre as colunas correspondentes (p<0,05)

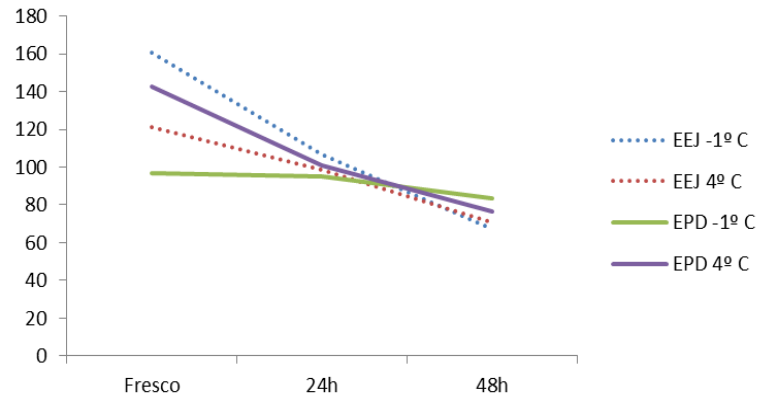
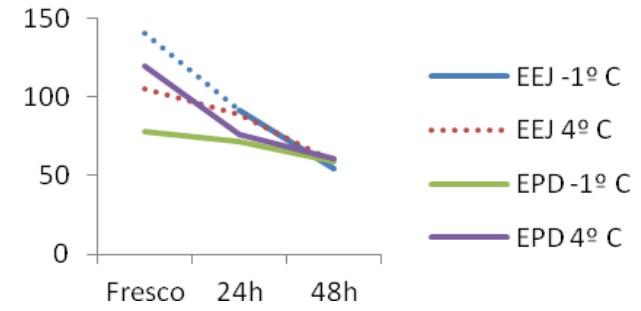
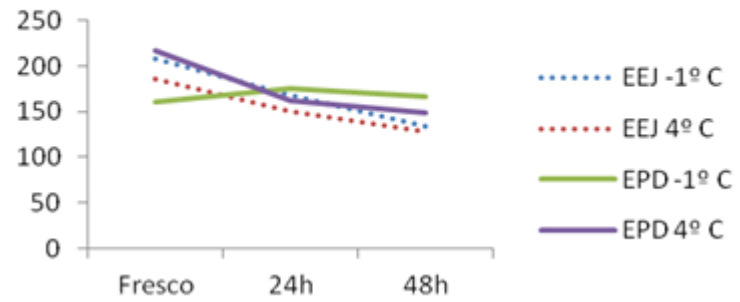
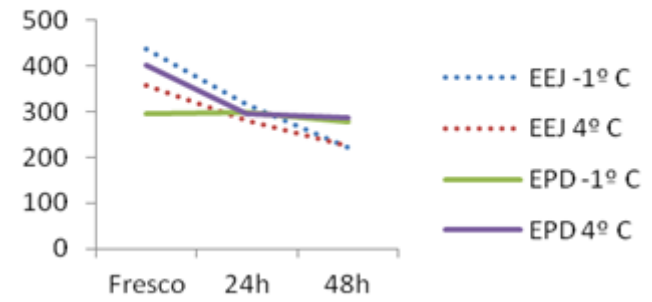
Tabela 4 - Porcentagem da redução das medianas (mínimo-máximo) dos valores entre o momento a fresco, 24 e 48 horas de refrigeração de espermatozoides colhidos por recuperação da cauda do epidídimo (EPD) de felinos domésticos.

Características Espermáticas	Refrigeração a -1°C			Refrigeração a 4°C		
	F - 24h	F - 48h	24h - 48h	F - 24h	F - 48h	24h - 48h
MT (%)	26,5 (-1 - 59)*	33,5 (15 - 72)*	9,5 (-7 - 33)	51 (-20 - 68)*	60 (-15 - 76)*	9 (-1 - 35)
MP (%)	7 (-16 - 38)*	11 (-10 - 41)*	5 (-9 - 19)	33 (-12 - 52)*	38 (-17 - 51)*	7 (-5 - 20)
VAP (µm/s)	-1,1 (-30,9 - 44,3)*	4,8 (-32,3 - 58)*	11,3 (-51 - 31,2)	56,6 (-32,2 - 108,7)*	76,9 (-22,9 - 168,9)*	15,2 (-12,4 - 73)
VSL (µm/s)	3,8 (-29,7 - 38,2)*	7,2 (-34,2 - 49,4)*	9,8 (-46,6 - 29,7)	42 (-34,3 - 91,1)*	60,1 (-22,9 - 144,3)*	14,8 (-7,3 - 64,2)
VCL (µm/s)	-5,9 (-60,9 - 69,9)*	-6,25 (-55,7 - 86,5)*	11,8 (-18,9 - 32,4)	61,9 (-17,1 - 118,8)*	74,2 (17,7 - 212,8)*	21,9 (-55,6 - 106,7)
ALH (µm)	0,8 (-1,3 - 7,5)*	0,6 (-0,7 - 7,5)*	0 (-1,1 - 4,8)	1,6 (0,4 - 3,8)*	2,7 (-0,10 - 7,1)*	0,9 (-3 - 6,5)
BCF (Hz)	-2,3 (-7 - 9,4)	-0,8 (-7,7 - 8,2)	0,5 (-10 - 6,9)	-6,1 (-23,6 - 5,9)	0,7 (-16,1 - 33)	4,8 (-6,3 - 41,3)
STR (%)	0,5 (-6 - 14)	1 (-8 - 13)	-0,5 (-4 - 11)	-2 (-10 - 14)	6 (-16 - 85)	5 (-7 - 92)
LIN (%)	5,5 (-7 - 14)	7 (-11 - 13)	1,5 (-18 - 9)	2 (-25 - 24)	8 (-21 - 66)	5 (-15 - 57)
AREA	1,2 (-0,6 - 4,6)	1,5 (0,1 - 5,5)	0,4 (-0,4 - 1,4)	0,8 (-0,1 - 2,8)	0,9 (-0,3 - 5,8)	0,2 (-1,5 - 5,1)
WOB	3,6 (-4,3 - 14,7)	6,4 (-8,59 - 16,31)	3,4 (-20,1 - 14,1)	5,5 (-26,8 - 30,1)	14 (-21,3 - 79,3)	6,1 (-12,1 - 61,3)
SVI	-0,9 (-87,1 - 122,3)*	-4,1 (-81,5 - 166)	22,5 (-90,7 - 75,5)	154,4 (-57,2 - 251,9)*	185,65 (-20,9 - 452,3)	36,2 (-55,1 - 200,3)
SMI	17,1 (-44,2 - 63,9)*	23,1 (-56,8 - 70,4)*	16 (-83,7 - 48,1)	36,6 (-84,4 - 138,1)*	79,6 (-64 - 350,9)*	19,2 (-27,2 - 246,4)
Morfologia						
Normais	3,5 (-22 - 72)	10 (-20 - 62)	10,5 (-15 - 25)	12 (-48,0 - 45)	8 (-49 - 47)	1 (-31 - 31)
Defeitos maiores	-10,5 (-55 - 3)	-20 (-65 - 11)*	-5,5 (-26 - 15)	-7 (-29 - 21)	1 (-38 - 31)*	0 (-19 - 27)
Defeitos menores	11 (-63 - 93)*	14,5 (-48 - 32)*	0,5 (-23 - 31)	-9 (-37 - 5)*	-9 (-39 - 11)*	3 (-30 - 16)
Total de defeitos	-3,5 (-72 - 22)	-10 (-62 - 20)	-10,5 (-25 - 15)	-12 (-45 - 48)	-8 (-47 - 49)	-1 (-31 - 31)
Integridade de Membrana						
Lesados	-3 (-20 - 8)	-3 (-13 - 8)*	0 (-7 - 7)*	-3 (-16 - 5)	-4 (-25 - 1)*	-2 (-19 - 7)*

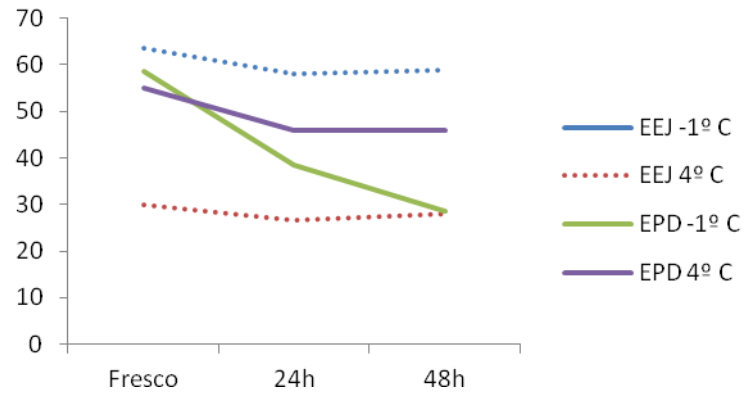
(*) Diferença significativa entre as colunas correspondentes (p<0,05)

Figura 1 – Gráficos representando a comparação das técnicas de colheita de espermatozoide (EEJ e EPD) e as duas temperaturas de refrigeração (-1°C e 4°C) em cada parâmetro.

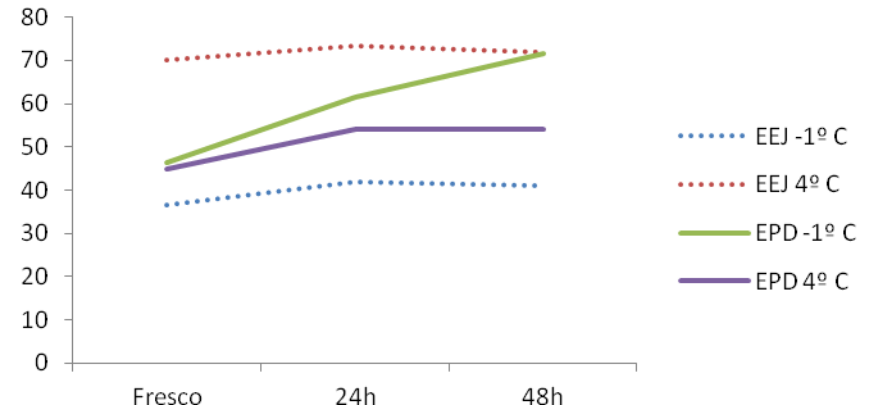


VAP**VSL****VCL****SVI**

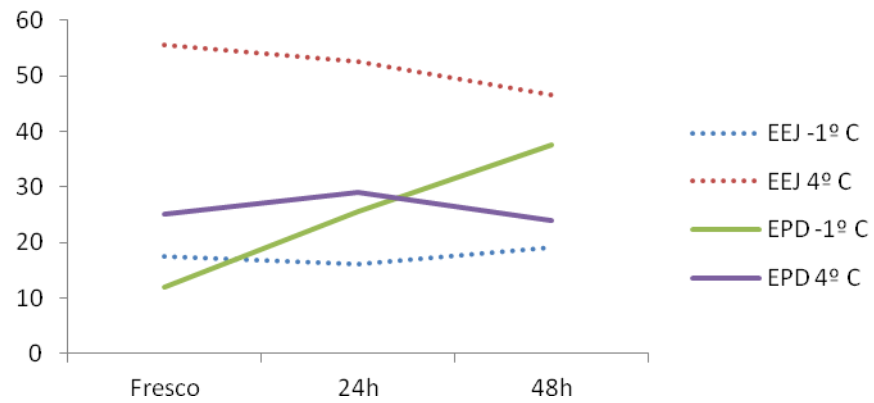
Células Normais



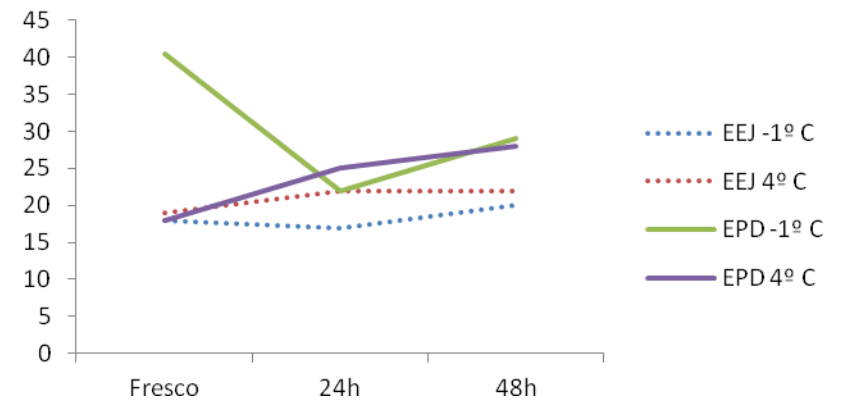
Total de Defeitos



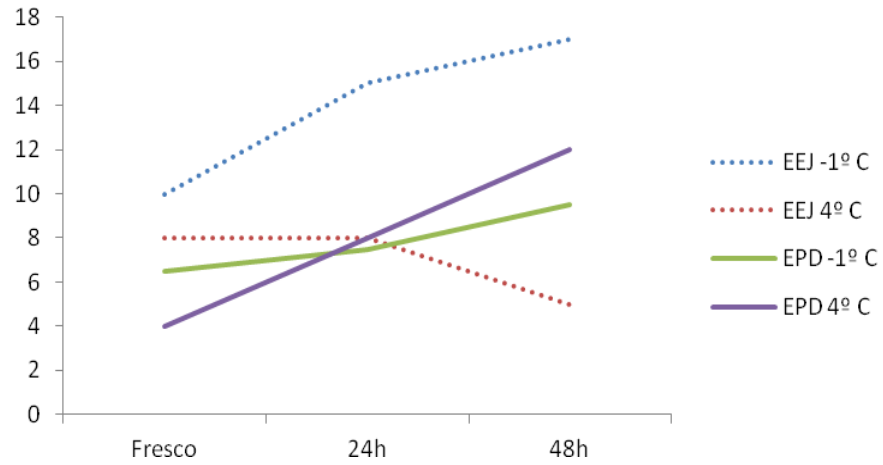
Defeitos Maiores



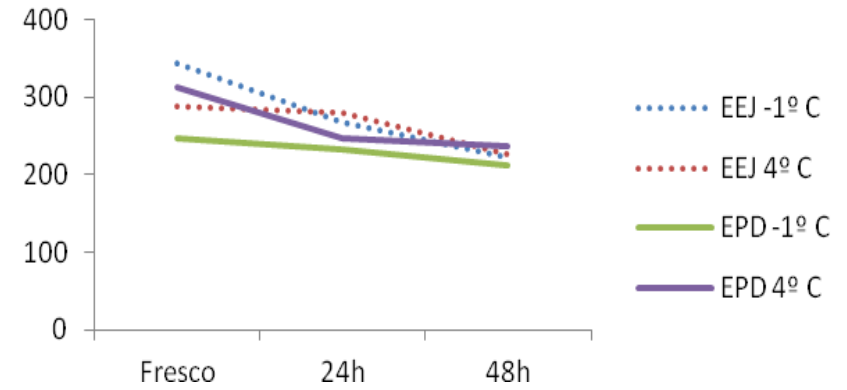
Defeitos Menores



Integridade de Membrana



SMI



6 ARTIGO II

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO SOB AS SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS DE FELINOS DOMÉSTICOS

INFLUENCE OF COOLING TEMPERATURE IN SPERM SUBPOPULATIONS OF DOMESTIC CATS

RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar e comparar as subpopulações espermáticas dos felinos domésticos, refrigerados a -1°C por 24 e 48 horas, assim como analisar a frequência de espermatozoides nas diferentes subpopulações. Foram utilizados 10 gatos adultos (2 a 6 Kg). A colheita dos espermatozoides foi realizada pela eletroejaculação (EEJ) e o meio de refrigeração foi o ACP - 117®. A cinética espermática foi avaliada por sistema computadorizado em três momentos: fresco, 24 e 48 horas após a refrigeração. Os ejaculados foram divididos em Grupo A (n=5, refrigeração a -1°C) e Grupo B (n=5, refrigeração a 4°C). Foram analisados individualmente 1560 espermatozoides, para identificar as subpopulações espermáticas por estatística multivariada. A comparação entre os Grupos -1°C e 4°C foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney utilizando o software SPSS 20.0 e as diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. O tamanho do efeito de significância foi avaliado pelo d_z de Conhen. Foram definidas três subpopulações espermáticas pela análise prévia do dendograma hierárquico. A análise dos componentes principais (CP) identificou a existência de três grupos com maior iteração nos três momentos: CP1 (VAP, VCL, VSL, ALH, SVI), CP2 (STR, LIN, WOB e SMI) e o CP3 (BCF). Houve uma tendência na diminuição da velocidade média (VAP) espermática na maioria dos grupos após 24 e 48 horas refrigeração. A subpopulação 1 após 48 horas de refrigeração a -1°C , e a subpopulação 3 após 24 horas de refrigeração a 4°C mantiveram a qualidade espermática, podendo caracterizar grupos de espermatozoides resistentes à criopreservação. A comparação dos valores da subpopulação 1 no momento das 48 horas entre os grupos A e B apresentaram efeito de significância médio, com melhores resultados no grupo -1°C . Os valores da distribuição das proporções dos espermatozoides em cada subpopulação se mostraram similares entre os grupos. O presente estudo identificou três subpopulações bem definidas de espermatozoides do ejaculado, com distribuições proporcionais entre os grupos e duas subpopulações resistentes a refrigeração.

Palavras-chave: Criopreservação. Gatos. Subpopulação Espermática. Estatística Multivariada. Cinética Espermática.

ABSTRACT

The objective of this study was to identify and compare the sperm subpopulations of domestic felines, chilled at -1°C for 24 and 48 hours, as well as to analyze the frequency of spermatozoa in the different subpopulations. Ten adult cats (2 to 6 kg) were used. Sperm harvesting was performed by electroejaculation (EEJ) and the cooling extender was ACP - 117 ®. Sperm kinetics were evaluated by computerized system in three moments: fresh, 24 and 48 hours after refrigeration. The ejaculates were divided into Group A (n = 5, refrigeration at -1°C) and Group B (n = 5, refrigeration at 4°C). 1560 spermatozoa were analyzed individually to identify the spermatid subpopulations by multivariate statistics. The comparison between groups -1°C and 4°C were analyzed by the Mann-Whitney test using SPSS 20.0 software and differences considered significant when $p < 0.05$. The size of the effect of significance was assessed by the d_z Cohen. Three sperm subpopulations were defined by prior analysis of the hierarchical dendrogram. The analysis of the main components (CP) identified three groups with higher iteration in the three moments: CP1 (VAP, VCL, VSL, ALH, SVI), CP2 (STR, LIN, WOB and SMI) and CP3 (BCF). There was a trend in decreasing the mean velocity (VAP) sperm in most groups after 24 and 48 hours refrigeration. Subpopulation 1 after 48 hours of refrigeration at -1°C and subpopulation 3 after 24 hours of refrigeration at 4°C maintained the sperm quality, being able to characterize groups of spermatozoa resistant to cryopreservation. The comparison of the values of subpopulation 1 at the 48 hour time between groups A and B showed an effect of mean significance, with better results in the -1°C group, having an effect of mean significance. The values of the distribution of sperm proportions in each subpopulation were similar between the groups. The present study identified three well-defined subpopulations of ejaculate spermatozoa, with proportional distributions between the groups and two refrigeration-resistant subpopulations.

Keywords: Cryopreservation. Cats. Spermatid subpopulation. Multivariate Statistics. Spermatid kinetics.

Introdução

A utilização do sistema CASA (*Computer-assisted sperm analysis*) permite a identificação da cinética das células espermáticas e o registro individual de suas trajetórias, detectando mudanças sutis nos parâmetros de velocidade sob diferentes condições experimentais (KRAEMER et al., 1998; FERREIRA, 2000). Contudo, há uma subutilização desta análise, pois a observação apenas dos valores médios da motilidade e de parâmetros cinéticos supõe que o ejaculado seja uniforme, ocasionando perda de informações importantes relacionadas ao reprodutor (AMANN et al., 1993; MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2011).

Diferentes populações espermáticas, com movimentos específicos, têm sido estudadas pelo sistema CASA a fim de aprimorar o entendimento das características das células e a existência de subpopulações bem definidas de espermatozoides dentro de ejaculados de mamíferos, tem sido aceita pela comunidade científica (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2011; CONTRI et al., 2012). A heterogeneidade de espermatozoides dentro de um ejaculado pode garantir um maior potencial de fertilização (CURRY, 2000). Com isso, é possível propor que alguns indivíduos, mesmo com valores de motilidade média semelhante, possam apresentar maior fertilidade por conterem diferentes subpopulações no ejaculado (HOLT e VAN LOOK, 2004).

A fim de identificar toda informação relevante, estudos têm utilizado análise estatística multivariável, com a realização da análise de componentes principais (CP) e procedimentos estatísticos de agrupamento (*cluster*) para identificar e monitorar o comportamento das subpopulações de espermatozoides frente a estresses, como por exemplo, a criopreservação.

Os padrões de distribuição das subpopulações de espermatozoides variam quando submetidos às mudanças de temperatura (MARTINEZ et al., 2006; DORADO et al., 2011a,b) e podem acarretar uma marcante redução da fertilidade. Os espermatozoides refrigerados por

24 horas apresentam comportamento diferente quando comparados aos frescos, sendo descritas mudanças da trajetórias não progressivas (DORADO et al., 2011a). A identificação de subpopulações com espermatozoides capazes de sobreviver e manter movimentos progressivos após determinado período de refrigeração se faz relevante no estudo da biotecnologia da reprodução, uma vez que podem indicar a qualidade da amostra (DAVIS et al., 1995; PEÑA et al., 2012).

A manutenção de uma estrutura de subpopulação global resistente à criopreservação poder ser importante para manter a função geral do ejaculado quando submetidas a desafios (FLORES et al., 2008). Portanto, o objetivo deste estudo é identificar e comparar as subpopulações espermáticas de gatos domésticos colhidos por eletroejaculação, refrigerados a -1°C por 24 e 48 horas, e adicionalmente analisar a frequência de espermatozoides nas subpopulações determinadas.

Material e Métodos

Aspectos Éticos

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais Institucional - CEUA de número 7099.2015.53.

Animais

Foram utilizados 10 gatos adultos, sem raça definida, semidomiciliados, em bom estado nutricional, pesando de 2 a 6 Kg. Todos os animais possuíam os dois testículos palpáveis no escroto e espículas penianas.

Delineamento Experimental

O ejaculado foi colhido por EEJ e diluído em meio ACP - 117® (ACP-Biotecnologia, Fortaleza, Brasil). A análise da cinética espermática foi executada por sistema computadorizado em três momentos: fresco, 24 horas e 48 horas após refrigeração em duas temperaturas: -1°C (grupo A, n=5) e 4°C (grupo B, n=5).

Colheita do Material

Para a eletroejaculação foi utilizado o protocolo anestésico com cetamina (12 mg/Kg - Dopalen®, Ceva, Brasil) associado a medetomidina (30µg/Kg - Dormitor®, Pfizer, França). Após a anestesia realizou-se a exposição peniana e cateterização uretral com cateter 24G acoplado a um microtubo de polipropileno de 1,5 mL.

Os estímulos elétricos foram produzidos por uma sonda transretal com dois eletrodos longitudinais, posicionada acima da próstata. O protocolo da eletroejaculação utilizado foi baseado em Howard et al. (1990).

Processamento dos Espermatozoides

As análises espermáticas foram realizadas, a fresco e após a refrigeração por 24 e 48 horas. Após a avaliação da cinética espermática a amostra foi centrifugada a 300g/10 minutos em microcentrífuga (MiniSpin Plus® – Eppendorf, São Paulo/SP, Brasil). O sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspenso no meio de refrigeração ACP- 117® (ACP-Biotecnologia, Fortaleza, Brasil. pH 7,43; 297 mOsm/ Kg H₂O; PL= 3,43g), preparado conforme recomendações do fabricante, na concentração final de 40 x 10⁶ espermatozoides/mL. As amostras foram divididas em tubos de 1,5 mL, e acondicionadas em um recipiente contendo 200 mL de água em temperatura ambiente e submetidos a refrigeração a -1°C (Grupo A) e a 4°C (Grupo B) por até 48 horas. Todas as análises e manipulação das amostras foram realizadas pelo mesmo técnico.

Avaliação Espermática pela Análise Computadorizada

Os parâmetros de cinética espermática foram analisados pelo sistema CASA (HTR-IVOS, version 14.0), conforme *setup* de felinos (Quadro 1). Sobre uma placa pré-aquecida a 37°C, foram colocados 3 µL da amostra na lâmina CellVu® (DRM-610, Millenium Sciences, New York, EUA) e inseridos no sistema CASA. Foram analisados cinco campos, com a seleção de 40 a 60 espermatozoides para a análise individual, sendo as células móveis ou paradas.

Foram obtidos os valores de motilidade total (% - MT); motilidade progressiva (% - MP); velocidade de trajeto (µm/s – VAP); velocidade progressiva (µm/s – VSL); velocidade curvilínea (µm/s – VCL); amplitude lateral da cabeça (µm – ALH); retilinearidade (% - STR) e linearidade (% - LIN). Baseado nos resultados, foram calculados os índices de movimento (SMI) e de velocidade (SVI), de acordo com Agarwal et al. (2003) modificado por Núñez-Martinez et al. (2006): $SMI = (VSL \times 0,59) + (VAP \times 0,37) + (LIN \times 0,95) + (STR \times 0,89) + (WOB \times 0,83)$ e $SVI = (VCL \times 0,87) + (VSL \times 0,76) + (VAP \times 0,90) + (ALH \times 0,92)$. A oscilação do movimento espermático (WOB) foi calculada pela fórmula $VAP/VCL \times 100$.

4.7. Análise Estatística

A matriz de dados consistiu em 1560 espermatozoides, sendo cada momento (fresco, 24 e 48 horas) com aproximadamente 500 células. Os espermatozoides foram analisados quanto à cinética espermática individualmente, com o *software* EDITY/SORT do HTR-IVOS (Version, 14.0), para extrair as subpopulações por procedimento de agrupamento. Todos os dados foram normalizados (Z) antes da aplicação da estatística multivariada.

Pela análise do agrupamento hierárquico foram identificados os componentes principais (CP) e baseado na análise prévia do dendograma (Figura 1) usando o método de

Ward (HOLT, 1996; HUSSON et al., 2010; BECERRIL et al., 2013) foi decidido pela utilização de três *clusters*, os quais foram submetidos à análise de agrupamento não hierárquico de k-médias para classificar os espermatozoides em um número reduzido de subpopulações, de acordo com seus padrões de movimento, de modo que cada espermatozoide pertencesse à apenas um *cluster*. Os testes foram realizados com software SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

A comparação entre os efeitos da refrigeração (temperatura e tempo), na frequência de distribuição relativa dos espermatozoides dentro das subpopulações foram analisadas pela ANOVA. As diferenças entre as medianas dos grupos (A e B) foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney utilizando o software SPSS 20.0, e foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O tamanho do efeito de significância foi avaliado pelo d_z de Conhen, pela fórmula $d = (Z/\sqrt{N})$. A classificação do tamanho do efeito foi interpretada como: valores superiores ou iguais a 0,8 representam efeito grande; entre 0,8 a 0,4 são considerados médios, entre 0,4 e 0,2 são pequenos e inferiores a 0,2 considerados insignificantes (LINDENAU e GUIMARÃES, 2012).

Resultados

Foram definidas três subpopulações espermáticas pela análise prévia do dendograma hierárquico (Figura 1). A análise dos componentes principais (CP) identificou a existência de três grupos com maior iteração nos três momentos: CP1 (VAP, VCL, VSL, ALH, SVI), CP2 (STR, LIN, WOB e SMI) e o CP3 (BCF).

Os valores da cinética espermática do grupo refrigerado a -1°C e a 4°C em cada momento avaliado (fresco, 24 e 48 horas de refrigeração) estão demonstrados na Tabela 1. Houve uma tendência na diminuição da velocidade média (VAP) espermática na maioria dos grupos do momento fresco para as 24 e 48 horas refrigeração, entretanto, na subpopulação 1

do grupo A (48 horas) e na subpopulação 3 do grupo B (24 horas) a qualidade espermática foi mantida.

A comparação entre as temperaturas de refrigeração (grupos A -1°C e B 4°C) nas subpopulações equivalentes dentro de cada momento (f, 24h e 48h) estão apresentados na Tabela 2. Embora algumas variáveis tenham sido diferentes, a maioria se mostrou insignificante por apresentarem valores abaixo de 0,2 no d_z de Cohen, contudo, os valores de comparação entre os grupos (-1° e 4°C) da subpopulação 1 no momento das 48 horas apresentaram efeito de significância médio, com valores de VAP, VCL, VSL, LIN, ALH, BCF, WOB, SMI e SVI do grupo refrigerado a -1°C superiores ao do grupo refrigerado a 4°C .

Os valores da distribuição das proporções dos espermatozoides em cada subpopulação estão dispostos na Tabela 1 e se mostraram similares entre os grupos, tendo destaque apenas a subpopulação 2 do grupo B nas 24 e 48 horas com porcentagens espermáticas acima de 50%, embora tenham apresentado valores de baixa velocidade e progressividade.

Para melhor visualização dos resultados da cinética espermática comparando os grupos refrigerados a -1 e a 4°C , foram elaborados gráficos (Figuras 2 a 4) de cada subpopulação nos diferentes momentos.

Discussão

A utilização de apenas uma variável para determinar a qualidade espermática tem sido questionada, uma vez que o sêmen é constituído por milhões de espermatozoides. Ao analisar os resultados dos componentes principais, foi observado que houve uma repetibilidade no padrão cinético espermático, com maior importância das características de velocidade (CP1), movimento (CP2) e BCF (CP3). O batimento da cauda do espermatozoide é elevado, superior a 80 bps (IGUER-OUADA e VERSTEGEN, 2001), considerando que o sistema CASA

captura apenas 25 a 60 imagens por segundo, seria necessário 200 observações por segundo para verificar com fidelidade a trajetória do espermatozoide (MORTIMER et al., 1997) tornando, portanto, a análise do BCF inconstante, e conseqüentemente possui uma importância menor.

Martinez et al. (2006) afirmaram que amostras espermáticas com velocidades elevadas podem indicar um bom sucesso na refrigeração, demonstrando que os critérios de ordem dos componentes principais do presente trabalho são coerentes com a literatura. A utilização dos índices dos CPs nos fornecem informações úteis sobre as características dos espermatozoides quando comparadas com a análise convencional e sugere um papel específico e importante à manutenção da estrutura subpopulacional, independente da espécie.

Durante a análise do dendograma foram observadas as iterações entre os parâmetros cinéticos analisados para que fossem formados os três *clusters*. Esta constatação está de acordo com o trabalho de Contri et al. (2012) que embora tenham utilizado três *clusters* nas subpopulações de felinos, o método estatístico foi diferente, pois os espermatozoides foram classificados de acordo com o peso de seus CPs pelo método da rede neuronal artificial e pela observação das densidades de Kernel para a seleção dos grupo.

O número de três *clusters* estabelecido nesse estudo foi semelhante aos artigos publicados de subpopulações espermáticas nas diferentes espécies, (FLORES et al., 2009; BEIRÃO et al., 2011; KANUGA et al., 2012; BERACOCHEA et al., 2014; VAZQUEZ et al., 2015; SANTALORIA et al., 2015; GALLEGO et al., 2017), entretanto, algumas publicações foram realizadas com quatro (4) (FLORES et al., 2008; MUIÑO et al., 2008a,b, 2009; DORADO et al., 2011a; PEÑA et al., 2012; FERRAZ et al., 2014; MAYA-SORIANO et al., 2015).

A identificação da cinética espermática obtidas por EEJ é importante por esta ser a técnica de eleição para a maioria dos felinos domésticos e selvagens. No conhecimento dos

autores, a respeito da descrição das subpopulações espermáticas de gatos foi mencionado somente em Contri et al. (2012), que comparou a cinética de espermatozoides colhidos por EEJ e EPD, evidenciando que o ejaculado apresentou valores significativamente mais elevados, porém, com resultados inferiores (Sub 1 - 34 [25,5-55,6]; Sub 2 - 143,9 [70,3-189,7]; Sub 3 -24,4 [15,2-128,8]) ao presente estudo (Sub 1 -73,1 [20,2-124,2]; Sub 2 -139,1 [92-166,3]; Sub 3 -133,2 [101,2-177,9]) no VAP nas amostras a fresco.

Os resultados das subpopulações demonstraram alta velocidade e progressividade no momento fresco, tanto no grupo refrigerado a -1°C quanto no grupo refrigerado a 4°C nas três subpopulações identificadas, comparado as 24 e 48 horas de refrigeração, enquanto que das três subpopulações no ejaculado, identificadas por Contri et al. (2012), foi observado que duas apresentaram subpopulações com baixa velocidade (VAP).

Duas subpopulações se destacaram pela elevada qualidade espermática mesmo após a criopreservação, pois mantiveram valores elevados de VAP e LIN. A subpopulação 1 do grupo A (48 horas) e subpopulação 3 do grupo B (24 horas) podem caracterizar grupos de espermatozoides resistentes a refrigeração, sendo um diferencial entre células com alta e baixa fertilidade (SATAKE et al., 2006; VAZQUEZ et al., 2015).

A refrigeração é utilizada como uma importante biotecnologia da reprodução, contudo, ocasiona danos a membrana plasmática e acrossoma consequentemente promove uma notável queda da qualidade espermática 24 horas após a refrigeração, não só na motilidade (VILLAVARDE et al., 2006), mas também na cinética espermática.

Na comparação dos grupos (-1° e 4°C) foi observada uma constância tanto de valores como de proporções entre as subpopulações, e embora algumas variáveis tenham apresentado diferença, o efeito foi insignificante pelo teste de d_z de Cohen. A exceção foi a subpopulação 1 que após 48 horas de refrigeração, os valores do grupo refrigerado a -1°C foram superiores aos do grupo refrigerado a 4°C , com efeito de significância médio. Este fato pode sugerir que

as características fisiológicas dos espermatozoides de felinos toleram baixas temperaturas e demonstram que ao serem refrigerados, além de apresentarem subpopulações superiores, possuem menores criolesões como relatado por Souza et al. (2017). Além disso, as células se adaptam melhor à fluidez da membrana plasmática (GARCIA-OLIVARES et al., 2016) refletindo positivamente na cinética espermática. Portanto, a refrigeração de espermatozoides a -1°C é uma opção viável na preservação de células espermáticas de felinos domésticos, embora a literatura determine 4°C como a temperatura ideal para a refrigeração espermática (GOODROWE et al., 1993; PUKAZHENTHI et al., 1999; HARRIS et al, 2001).

As populações espermáticas tem o papel de serem cada vez mais caracterizadas, identificando padrões com significados biológicos consistentes, assim como, relacionar as subpopulações específicas com fatores como criopreservação, capacitação e fertilização. A identificação das subpopulações ainda se faz relevante para selecionar os machos que possuem uma maior porcentagem de subpopulações superiores e que se desenvolvam melhor nas biotecnologias. Ainda hoje é necessário clarificar o significado das subpopulações e testar se correspondem a uma realidade funcional ou fisiológica, porém, futuramente, as subpopulações superiores poderão ser classificadas de forma automatizadas e selecionadas para a utilização de procedimentos mais caros como a FIV e a ICSI, garantindo melhores resultados.

Conclusão

O presente estudo identificou três subpopulações espermáticas bem definidas no ejaculado de gatos, com distribuições proporcionais entre os grupos. Foram identificadas duas subpopulações resistentes à refrigeração espermática com o intuito de selecionar os reprodutores superiores.

Referências

- AGARWAL, A., SHARMA, R.K. & NELSON, D.R. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. **Journal of Andrology**, 24, 343–352, 2003.
- AMANN, R.P. Computerized measurements of sperm velocity and percentage of motile sperm. In: Fawcett DW, Bedford GM, editors. *The Spermatozoon*. Baltimore, MD: **Urban & Schwarzenberg**, 431–435, 1979.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function, *Equine Reproduction*. Philadelphia: **Lea & Febiger**, 715–45, 1993.
- BERACOCHEA, F.; GIL, J.; SESTELO, A.; GARDE, J.J.; SANTIAGO-MORENO, J.; FUMAGALLI, F.; UNGERFELD, R. Sperm characterization and identification of sperm subpopulations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Animal Reproduction Science**, 149, 224–230, 2014.
- BECERRIL, M.; HUERTA, C.; MÉNDEZ, M.; HERNÁNDEZ, G.; ARAGÓN, M. Use of multivariate statistics to identify unreliable data obtained using CASA. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, 59, 164–171, 2013.
- BEIRÃO, J.; CABRITA, E.; PÉREZ-CEREZALES, S.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; HERRÁEZ, M.P. Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. **Cryobiology** 62, 22–31, 2011.
- CONTRI, A.; ZAMBELLI, D.; FAUSTINI, M.; CUNTO, M.; GLORIA, A.; CARLUCCIO, A. Artificial neural networks for the definition of kinetic subpopulations in electroejaculated and epididymal spermatozoa in the domestic cat. **Reproduction**, 144, 339–347, 2012.
- CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, 5, 46–52, 2000.
- DAVIS, R.O.; DROBNIS, E.Z.; OVERSTREET, J.W. Application of multivariate cluster, discriminate function, and stepwise regression analyses to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. **Fertility and Sterility**, 63, 1051–1057, 1995.
- DORADO, J.; GÁLVEZ, J.M.J.; MURABITO, M.R.; MUÑOZ-SERRANO, A., HIDALGO, M. Identification of sperm subpopulations in canine ejaculates: Effects of cold storage and egg yolk concentration. **Animal Reproduction Science**, 127, 106– 113, 2011a.
- DORADO, J.; ALCARÁZ, L.; DUARTE, N.; PORTERO, J.M.; ACHA, D.; HIDALGO, M. Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. **Animal Reproduction Science**, 125, 211– 218, 2011b.
- FERRAZ, M.A.M.M.; MORATÓ, R.; YESTE, M.; ARCARONS, N.; PENA, A.I.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C.O.; MUIÑO, R.; MOGAS, T. Evaluation of sperm

subpopulation structure in relation to in vitro sperm–oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. **Theriogenology**, 81, 1067–1072, 2014.

FERREIRA, J.C.P. Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelamento do sêmen equino. **Tese de Doutorado** - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu, 2000.

FLORES, E.; TABERNER, E.; RIVERA, M.M.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; MIRÓ, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. **Theriogenology**, 70, 936–945, 2008.

FLORES, E.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J.M.; PEÑA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. **Theriogenology**, 72, 784–797, 2009.

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

HOLT, W.V. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. **Reproduction Domestic Animal**, 31, 17–24, 1996.

HOLT, W.V., VAN LOOK, K.J.W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. **Reproduction**, 127, 527–535, 2004.

HUSSON, F.; JOSSE, J.; PAGÈS, J. Principal components methods hierarchical clustering-partitional clustering: why would we need to choose for visualizing data. Technical Report, **Agrocampus**, 1–17, 2010.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. Evaluation of the "Hamilton Thorn Computer-based Automated System" for dog semen analysis. **Theriogenology**, 55, 733-749, 2001.

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

KRAEMER, M.; FILLION, C.; MARTIN-PONT, B.; AUGER, J. Factors influencing human sperm kinematic measuring by the celltrak computer-assisted sperm analysis system. **Human Reproduction**, 13, 611-619, 1998.

LARSEN, L.; SCHEIKE, T.; KOLD, J.L.; PETER, B.J.; ERNST, E.; HENRIK, H.N.; ZHOU, Y.; ERIK, S.N.; GIWERCMAN, A. Danish first pregnancy planner study team. Computer assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. **Human Reproduction**, 15, 1562–1567, 2000.

LINDENAU, J. D.; GUIMARÃES, L.S.P. Calculating the Effect Size in SPSS. **Revista HCPA**, 32, 3, 2012.

MARTINEZ, I.N.; MORAN, J.M.; PENA, F.J. Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. **Journal of Andrology**, 27, 596–603, 2006.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; TIZADO, E. J.; GARDE, J. J.; ANEL, L.; PAZ, P. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. **Theriogenology**, 75, 783–795, 2011.

MARTINS, M; JUSTINO, R. Criopreservação espermática em felinos: estado da arte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 39, 1, 136-140, 2015.

MAYA-SORIANO, M.J.; TABERNER, E.; SABÉS-ALSINA, M.; RAMON, J.; RAFEL, O.; TUSELL, L.; PILES, M.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Daily exposure to summer temperatures affects the motile subpopulation structure of epididymal sperm cells but not male fertility in an in vivo rabbit model. **Theriogenology**, 84, 384–389, 2015.

MORTIMER, S.T.; SCHOEVAERT, D.; SWAN, M.A.; MORTIMER, D. Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa. **Human Reproduction**, 12, 1006–1012, 1997.

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

MUIÑO, R.; RIVERA, M.M.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J.E.; PEÑA, A.I. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. **Animal Reproduction Science**, 109, 50–64, 2008b.

MUIÑO, R.; PEÑA, A.I.; RODRÍGUEZ, A.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C.O. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. **Theriogenology**, 72, 860–868, 2009.

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

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

PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E.; HOWARD, J.G. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. **Journal of reproduction and fertility supplement**, 57, 423-433, 2001.

SANTOLARIA, P; VICENTE-FIEL, S.; PALACÍN, I.; FANTOVA, E.; BLASCO, M.E.; SILVESTRE, M.A.; YÁNIZ, J.L. Predictive capacity of sperm quality parameters and

sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. **Animal Reproduction Science**, 163, 82–88, 2015.

TSUTSUI, T.; WADA, M.; ANZAI, M.; HORI, T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 65, 397–399, 2003.

VÁZQUEZA, A.J.F.; CEDILLOA, M.J.; QUEZADAB, V.J.; RIVASB, A.C.; MORALESB, E.C.L.; AYALAC, E.M.E.; HERNÁNDEZB, M.J.; GONZÁLEZB, R.A.; ARAGÓN B, M.A. Effects of repeated electroejaculations on kinematic sperm subpopulations and quality markers of Mexican creole goats. **Animal Reproduction Science**, 154, 29–38, 2015.

VIDAMENT, M.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E.; CLEMENT, F. Equine artificial insemination in French National Studs. **Reproduction Domestic Animal**, 6, 61–66, 2000.

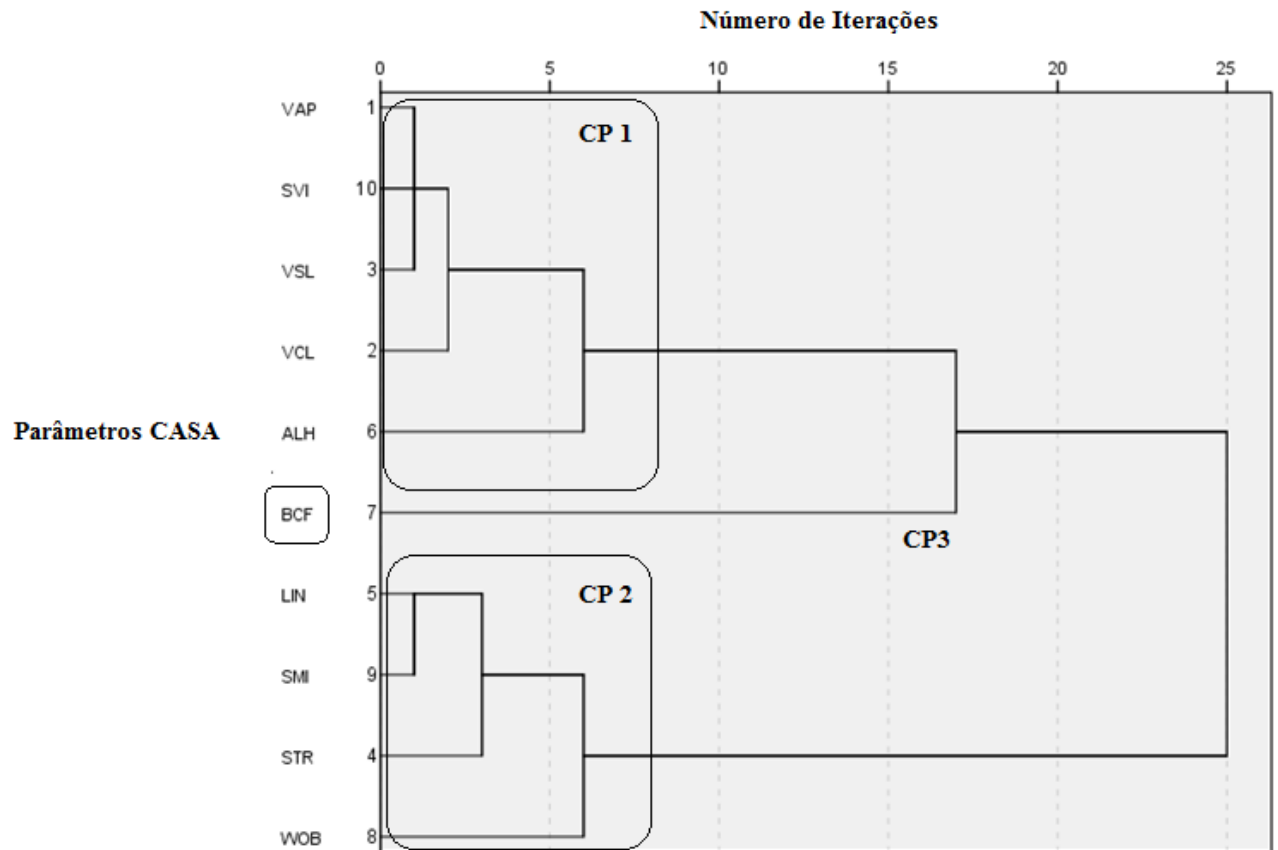
VILLAVERDE, A.I.S.B.; MARTINS, M.I.M.; CASTRO, V.B.; LOPES, M.D. Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*). **Theriogenology**, 66, 1641–1644, 2006.

ZAMBELLI D.; CUNTO M. Semen collection in cats: Techniques and analysis. **Theriogenology**, 66, 159–165, 2006.

Quadro 1 – *Setup* utilizado no HTR-IVOS 14.0 para avaliação dos espermatozoides de felinos

Parâmetros	Valores
Tipo de Câmara	Cell-Vu®
Temperatura da Análise (°C)	37
Campos adquiridos	30
Quadros (Hz)	60
Número de quadros	5
Contraste estático mínimo	40
Tamanho mínimo da célula (pixels)	4
Retiliniaridade (STR), limiares (%)	80
VAP cut-off ($\mu\text{m/s}$)	30
Mínimo progressivo VAP ($\mu\text{m/s}$)	70
VSL cut-off ($\mu\text{m/s}$)	20
Intensidade da célula	50
Magnificação	1,89

Figura 1 – Dendograma mostrando a existência de três componentes principais (caixa CP1; CP2 e CP3) utilizando os parâmetros cinéticos obtidos na análise computadorizada de sêmen de felinos.



Motilidade total (% - MT); motilidade progressiva (% - MP); velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$ - VAP); velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$ - VSL); velocidade curvilinear ($\mu\text{m/s}$ - VCL); amplitude lateral da cabeça (μm - ALH); retilinearidade (% - STR) e linearidade (% - LIN); oscilação do movimento espermático (WOB - %); índices de movimento ($\mu\text{m/s}$ - SMI) e de velocidade ($\mu\text{m/s}$ - SVI).

Tabela 1 – Mediana (25th – 75th) das subpopulações espermáticas (1 a 3) identificadas em felinos domésticos coletados por Eletroejaculação (EEJ) em três momentos (fresco, 24 e 48 horas de refrigeração) comparando o grupo A (refrigerado a -1°C) e o grupo B (refrigerado a 4°C).

Parâmetros	Grupo A Fresco			Grupo A 24 Horas			Grupo A 48 Horas		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
VAP	73,1 (20,2-124,2)	139,1 (92-166,3)	133,2 (101,2-177,9)	30,5 (11,1-130,3)	45,6 (25,3-80,9)	59,3 (23-101,4)	79,8 (63,4-103,4)	18,4 (10,5-26,8)	38,2 (20,8-58,4)
VCL	125 (46,4-198)	202,4 (173,6-251,8)	184,7 (151,3-223,8)	85,7 (31,4-208,3)	136,4 (97,4-181,1)	127,4 (74,1-171,9)	153,6 (133,7-184,7)	47,8 (25,3-70,8)	124,2 (63,6-154,9)
VSL	59,4 (15,7-101)	91,8 (43,8-144,8)	116,6 (68,1-165,6)	19,9 (8,9-118,1)	35 (11,5-61,7)	44,4 (13,7-90,8)	65,5 (49-81,1)	11,8 (8,4-17,8)	17,5 (9,1-28,2)
STR	84 (71-89)	83 (46,5-91)	93,5 (71,2-98)	88 (75,5-94)	67,5 (38,7-84,2)	81 (58,2-90)	84 (76-92)	80 (69-90)	54,5 (33,5-84,7)
LIN	45 (33-57)	48 (22,5-66,5)	66 (38,2-87,7)	44 (32,5-61)	24,5 (11-36,5)	39,5 (20,5-54,7)	43 (35-52)	30 (23-40)	17 (10,2-42)
ALH	5,4 (3,2-7,6)	7,6 (5,9-9,9)	5,8 (3,8-7,8)	4,1 (1,3-5,6)	5,6 (3,9-7,5)	4,7 (3,5-6,3)	6,2 (4,9-8,3)	2,6 (1,2-4,2)	4,9 (3,3-6,5)
BCF	40 (33,3-51)	40 (30-48,7)	38,4 (30-46)	46,2 (36,9-52,8)	44,1 (31,7-60)	43,2 (34,6-54,6)	36,9 (32,5-42,2)	41,5 (33,6-50)	46,7 (36,2-60)
WOB	55,6 (45,3-64,8)	62,9 (47-77,6)	72,2 (57,9-89,7)	54,7 (39-66)	34,9 (26,1-47,7)	48,7 (36-61,7)	52,7 (46,6-59,3)	38,8 (33,3-47,1)	35,4 (27,1-48,6)
SMI	224,7 (159,2-271,9)	260,8 (171,9-351,2)	325,1 (219,7-400,9)	214,3 (147,3-299,6)	160,7 (85,8-210,8)	205,3 (117,9-271,1)	226,2 (193,7-264,7)	149 (123,5-171,4)	120,5 (88,9-193,4)
SVI	228,5 (81,3-384,2)	396,2 (290,1-474,6)	373,6 (299,5-470)	133,8 (42,6-400,5)	201,7 (116,4-272,5)	218,3 (98,6-311,3)	255,1 (222,2-321,2)	68,8 (39,1-102,4)	166,3 (86,8-224,9)
Proporção	30,80%	44,90%	24,20%	43,90%	32,70%	23,30%	34%	32,30%	33,60%
Parâmetros	Grupo B Fresco			Grupo B 24 Horas			Grupo B 48 Horas		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
VAP	120,3 (28,2-160,5)	142,8 (111-175,6)	68,8 (40,3-100,2)	22,5 (13,3-97,7)	35,5 (22,5-64,9)	64,7 (12,4-82,1)	22,1 (11,9-57,7)	21,9 (14,2-55,4)	36,8 (12,3-76,6)
VCL	176,4 (85,5-221,1)	209,7 (174,3-252,8)	144,6 (92,5-198,1)	63,2 (30,6-178,2)	98,7 (60,1-140,7)	83,5 (30,7-132,6)	61,2 (34-115,9)	54,1 (27,9-99,2)	92,3 (40,6-157,1)
VSL	101,3 (19,4-150,5)	125,4 (90-159,1)	36,1 (24,5-57,7)	15,6 (9,7-69,5)	22,2 (10-53,6)	61,6 (10,5-81,2)	11,2 (7,8-36,4)	18,1 (10,2-49,9)	18,2 (7,2-69,7)
STR	89 (67,2-96)	92 (83-96,2)	60,5 (41-89,2)	87 (62,5-93,7)	74 (49-84)	92 (87-96)	77 (56-88)	90 (77,5-95)	72,5 (55,5-86,2)
LIN	57,5 (26-67)	61,5 (49,7-72,2)	29 (15-46)	41,5 (25-58)	25 (16,5-39,5)	52 (37-85)	30 (17-44)	46 (28-61)	24,5 (16,7-43,2)
ALH	5,2 (3,8-7,7)	6,5 (5-8,5)	7,8 (5,8-9,1)	3,5 (1,5-5,5)	4,8 (3-6,7)	2,2 (1,5-5,4)	3,6 (1,6-5,6)	2,7 (1,4-4,3)	3,1 (2,3-5,5)
BCF	46,4 (38,8-55,4)	45 (34,6-50,8)	38,7 (30-45,8)	43,8 (36,9-50,8)	45 (36,9-52,6)	37,5 (21,6-43,8)	42,5 (36,9-53,1)	40,8 (32,9-48,5)	46,4 (40-54,2)
WOB	65 (42,5-72,6)	69,8 (57,1-77,9)	53,5 (42,2-62,5)	50,6 (35,5-63,3)	41,6 (29,8-51,3)	54,4 (40,6-88,3)	39,9 (32-53,3)	53,9 (33,9-64,4)	38,7 (29,1-51,3)
SMI	290,7 (140,8-346,3)	328,4 (267,2-371,9)	176 (136,1-226,9)	193,5 (136,4-246,3)	149 (104,4-205,7)	254,4 (163,1-319,1)	148,9 (109,7-193)	188,8 (142,4-240)	142,7 (103,9-234,5)
SVI	350,3 (131,3-441,5)	408,3 (330,6-509,5)	215,3 (140,7-310,1)	94,4 (49,2-313,7)	137,4 (90,4-223,2)	170,1 (47,8-235,8)	89,9 (48,5-206,3)	86,8 (49,7-173,9)	145 (53,2-262)
Proporção	32,20%	35,50%	32,20%	17,70%	52,70%	29,50%	25,40%	50,90%	23,60%

Tabela 2 – Comparação entre as medianas do grupo A (refrigerado a -1°C) com o grupo B (refrigerado a 4°C), na subpopulação 1, 2 e 3, em cada momento (fresco, 24 e 48 horas de refrigeração)

SUBPOPULAÇÃO 1						
	FRESCO		24 Horas		48 Horas	
	d	VALOR_p	d	VALOR_p	d	VALOR_p
VAP	-0,2358942	0,0037469	-0,0801983	0,2652145	-0,5969572	0,001
VCL	-0,1774892	0,0291817	-0,0796401	0,2685555	-0,5797825	0,001
VSL	-0,2480339	0,0023045	-0,1222474	0,0894482	-0,6389165	0,001
STR	-0,1463369	0,0721424	-0,0827518	0,2502985	-0,2479391	0,001
LIN	-0,1939206	0,0171752	-0,1056567	0,1421505	-0,3852352	0,001
ALH	-0,0159322	0,844784	-0,0294318	0,6826279	-0,4797073	0,001
BCF	-0,2010263	0,0135018	-0,0677309	0,3467319	-0,3145582	0,001
WOB	-0,1915968	0,0185536	-0,1019166	0,1568134	-0,3979724	0,001
SMI	-0,2310383	0,0045249	-0,1538956	0,0325178	-0,555943	0,001
SVI	-0,218599	0,0072272	-0,0906852	0,2077273	-0,6005773	0,001
SUBPOPULAÇÃO 2						
	FRESCO		24 Horas		48 Horas	
	d	VALOR_p	d	VALOR_p	d	VALOR_p
VAP	-0,1126238	0,1455529	-0,1122579	0,1794633	-0,2323881	0,0041691
VCL	-0,0403909	0,6016942	-0,31933	0,0001342	-0,1292869	0,1109458
VSL	-0,2023269	0,0089322	-0,0601077	0,4722744	-0,2934996	0,0002963
STR	-0,346162	7,699E-06	-0,0735005	0,3794348	-0,293278	0,0002995
LIN	-0,2461113	0,0014704	-0,1138215	0,1734799	-0,3140668	0,0001079
ALH	-0,1796825	0,0202324	-0,1576649	0,0593761	-0,0408068	0,6148941
BCF	-0,1398179	0,0707863	-0,0373835	0,6548446	-0,0692772	0,3930459
WOB	-0,1574739	0,0418497	-0,1669449	0,0458936	-0,2752782	0,0006892
SMI	-0,2214051	0,0042206	-0,0399584	0,632769	-0,3381898	3,053E-05
SVI	-0,1174549	0,1290518	-0,2194327	0,0086895	-0,1997229	0,013803
SUBPOPULAÇÃO 3						
	FRESCO		24 Horas		48 Horas	
	d	VALOR_p	d	VALOR_p	d	VALOR_p
VAP	-0,5354891	1,623E-12	-0,1280895	0,1851819	-0,051087	0,5426758
VCL	-0,3107313	4,152E-05	-0,3136118	0,0011785	-0,1095951	0,1915604
VSL	-0,6115711	7,194E-16	-0,0159727	0,8687685	-0,0588548	0,4830938
STR	-0,4540465	2,108E-09	-0,4656782	1,457E-06	-0,2033725	0,0153733
LIN	-0,5289943	2,996E-12	-0,3656063	0,0001557	-0,230663	0,0059838
ALH	-0,258536	0,0006489	-0,3468702	0,0003332	-0,1864479	0,026298
BCF	-0,0178047	0,814317	-0,2932979	0,0024142	-0,0116198	0,8898718
WOB	-0,4889541	1,12E-10	-0,2997881	0,0019285	-0,0928532	0,2685218
SMI	-0,576669	2,81E-14	-0,2764439	0,0042423	-0,1905388	0,0231753
SVI	-0,5245513	4,539E-12	-0,1812244	0,0608479	-0,0334824	0,6899017

Foi realizado o teste Mann-Whitney para verificar a diferença entre os grupos em cada subpopulação ($p < 0,05$) seguida do d_z de Cohen para observar o efeito da significância.

Figura 2 – Comparação das variáveis da cinética espermática de felinos domésticos, no Grupo A (refrigerado a -1°C) e no Grupo B (refrigerado a 4°C), na subpopulação 1 (a), subpopulação 2 (b) e subpopulação 3 (c) no momento Fresco.

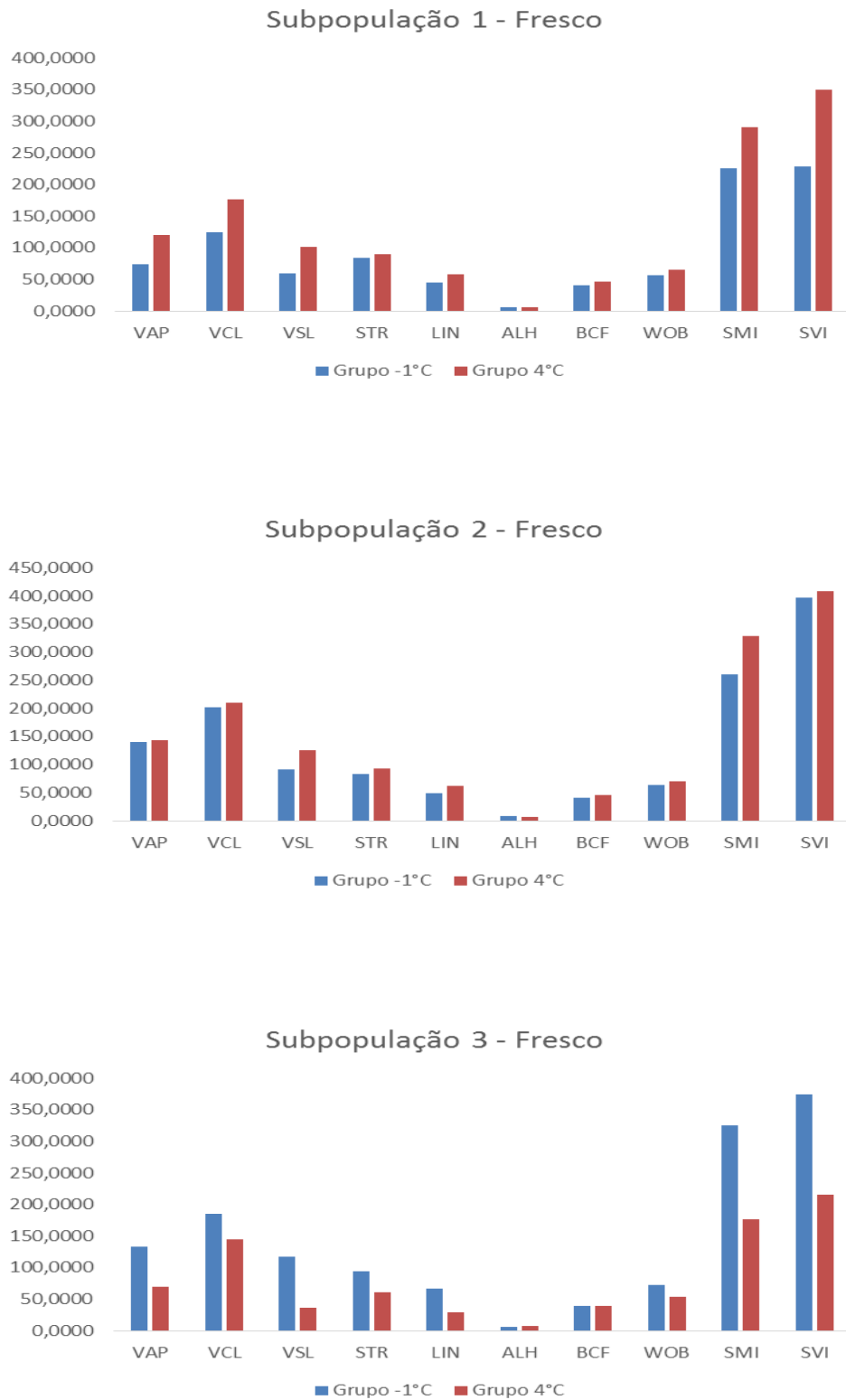


Figura 3 – Comparação das variáveis da cinética espermática de felinos domésticos, no Grupo A (refrigerado a -1°C) e no Grupo B (refrigerado a 4°C), na subpopulação 1 (a), subpopulação 2 (b) e subpopulação 3 (c) após 24 horas de refrigeração.

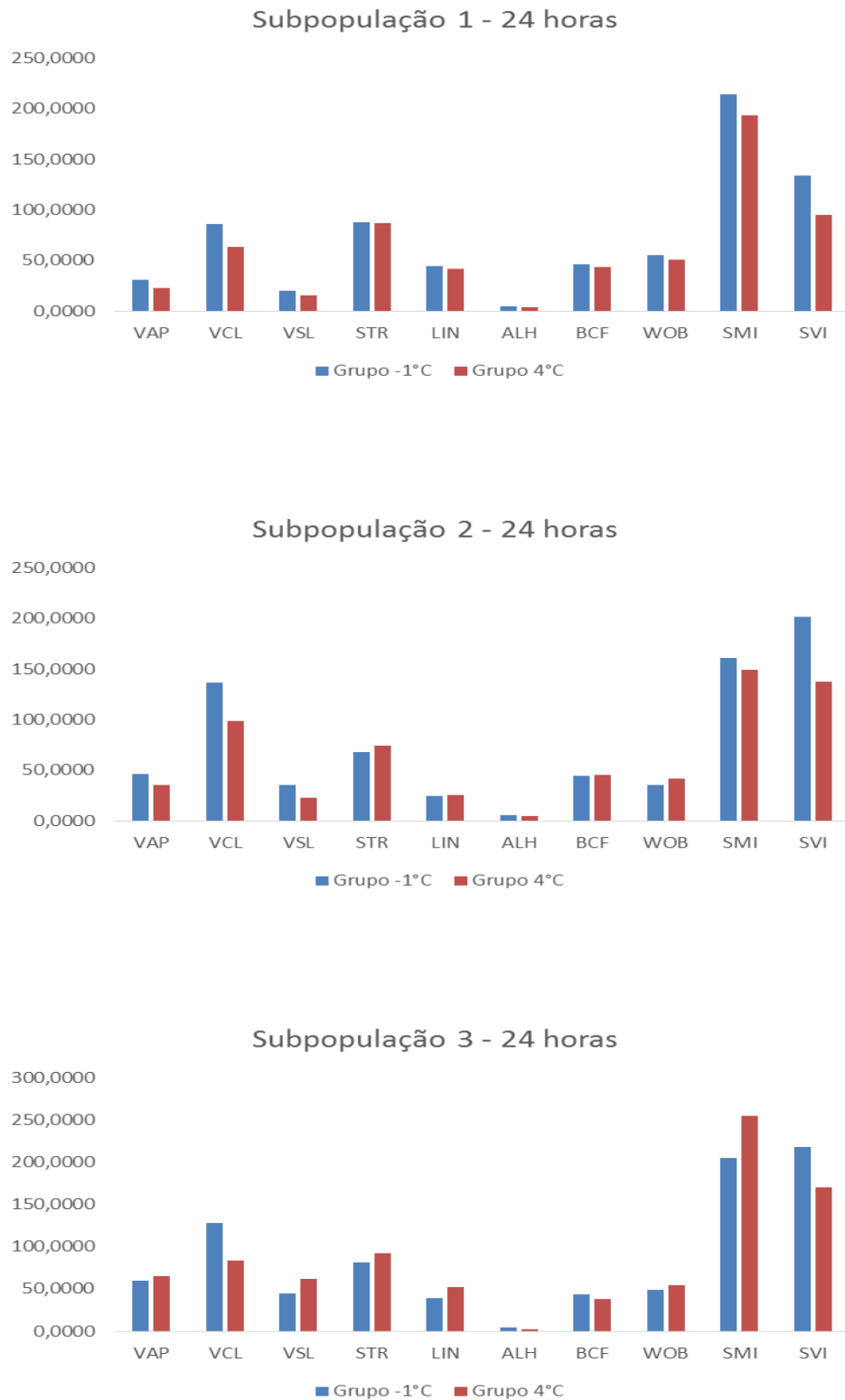
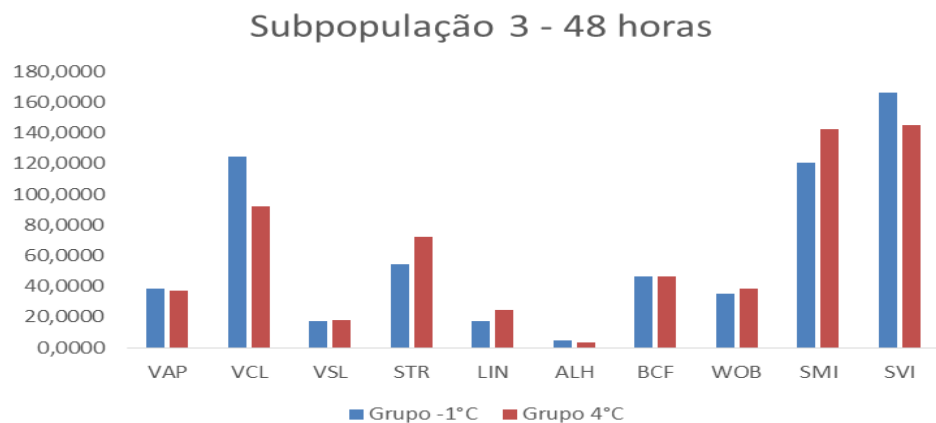
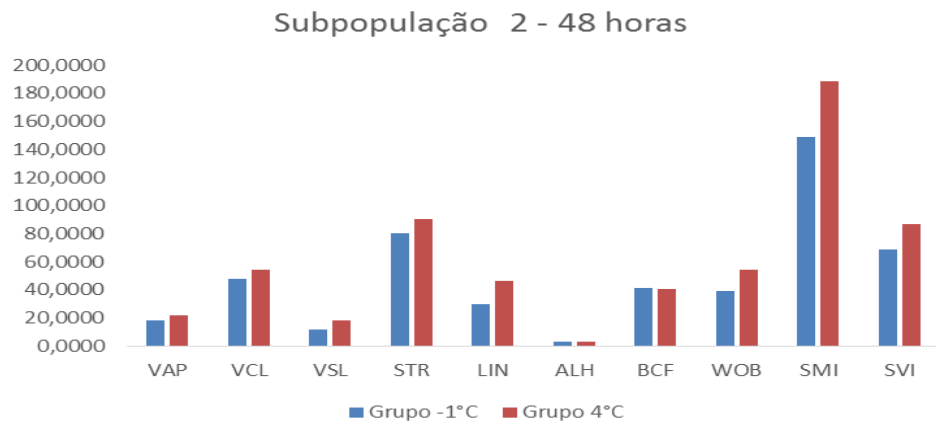
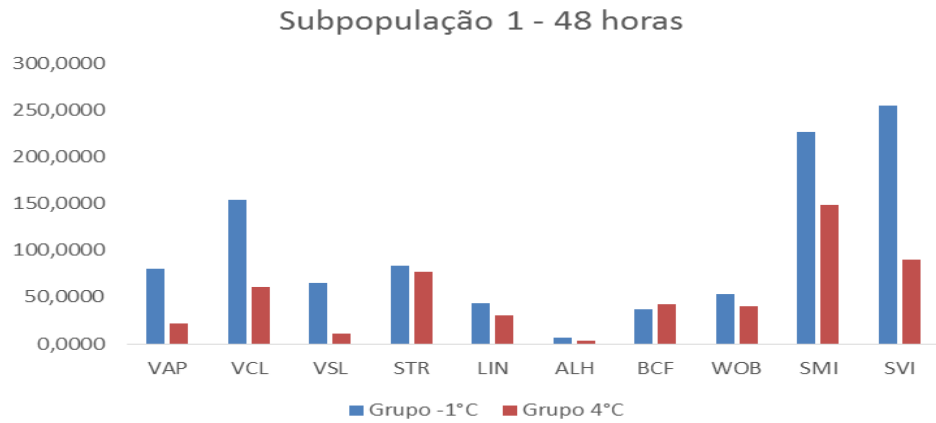


Figura 4 – Comparação das variáveis da cinética espermática de felinos domésticos, no Grupo A (refrigerado a -1°C) e no Grupo B (refrigerado a 4°C), na subpopulação 1 (a), subpopulação 2 (b), subpopulação 3 (c) após 48 horas de refrigeração.



7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a realização deste estudo foi possível concluir que a refrigeração a -1°C de espermatozoides felinos por até 48 horas foi eficiente para manter a qualidade espermática colhida por EEJ e pela EPD, podendo ser uma nova alternativa à criopreservação espermática de felinos domésticos.

O presente estudo identificou três subpopulações espermáticas bem definidas no ejaculado de gatos, com distribuições proporcionais entre os grupos. Foram identificadas duas subpopulações mais resistentes à refrigeração espermática.

Como perspectivas futuras, novos estudos devem ser elaborados no sentido de caracterizar ainda mais as amostras de espermatozoides e considerar diferentes abordagens quanto à espécie, origem, forma de colheita, diluentes, armazenamento/criopreservação e de que forma será utilizado, pois as subpopulação podem ter diferentes significados em cada um destes contextos, e será necessário o entendimento mais aprofundado desses mecanismos.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 112/2015

Londrina, 19 de Junho de 2015.

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UUEL reunida em 19 de Maio de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "A cinética espermática de cães e gatos, reconhecimento das subpopulações e suas influências na qualidade pós-criopreservação", registrado sob o processo CEUA nº7099.2015.53, pesquisa do Centro de Ciências Agrárias, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 40 gatos SRD machos, com idade entre 1 e 6 anos e pesando de 1 a 4,5 kg e 40 cães SRD machos, também com idade entre 1 e 6 anos, pesando de 2 a 45 kg, os animais serão oriundos de proprietários particulares que procurarem o Hospital Veterinário com interesse em castrar seus animais. O projeto tem como objetivo detectar o efeito da refrigeração a 4-5°C por 12, 24 e 48 horas após descongelamento de espermatozoides epididimários de cães e gatos. Para tanto, os animais serão recebidos com 8 horas de restrição hídrica e alimentar no dia da cirurgia, será realizado anamnese e exame físico completo dos animais antes de iniciar o procedimento e os mesmos serão contidos de forma manual para coleta de sangue e aplicação do medicamento pré-anestésico (tranquilizante) via intramuscular. Após a sedação, os animais serão encaminhados ao centro cirúrgico onde será realizada canulação (inserido cateter via endovenosa), tricotomia (retirada dos pelos através de uma máquina de tosa) e a antissepsia da região escrotal, posteriormente, será realizada orquiectomia eletiva retirando os dois testículos juntamente com o epidídimo. Os animais permanecerão em jaulas individuais durante quatro horas após a recuperação anestésica para observação. Os protocolos experimentais estão aprovados com previsão para execução em 20 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UUEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Waldiceu Aparecido Verrini Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrini Junior
Coordenador da CEUA/UUEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins

Coordenadora do Projeto

Departamento de Clínicas Veterinárias

Centro de Ciências Agrárias

Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DCA/PROPPG), Diretor(a) do Hospital Veterinário, Chefe do Departamento de Clínicas Veterinárias e Diretor(a) do Centro de Ciências Agrárias.