

RANQUEAMENTO/AGRUPAMENTO DO SÊMEN CONGELADO DE CARNEIROS DA RAÇA SANTA INÊS ANALISADAS PELO SISTEMA CASA E SONDAS FLUORESCENTES PELA ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA

Daniel Bartoli de Sousa¹
Sony Dimas Bicudo²
Hymerson Costa Azevedo²
Marciane Silva Maia²

RESUMO

O processo de criopreservação acarreta uma série de alterações resultando em uma marcante redução da fertilidade. Buscam-se novas formas de avaliação do movimento espermático, tais como a análise das sub-populações espermáticas pelo sistema CASA. Sondas fluorescentes vêm sendo estudadas para avaliação da integridade do espermatozóide, fornecendo informações adicionais sobre sua funcionalidade. Tem-se como objetivo otimizar o emprego do sistema CASA em combinação de sondas fluorescentes como nova forma de avaliação dos parâmetros qualitativos do sêmen congelado de ovinos. Em vinte e seis partidas de sêmen congelado procederam-se as avaliações CASA e Teste MITO. Utilizou-se a análise fatorial com método de rotação VARIMAX e análise de agrupamentos com método de Ward. Para análise optou-se por considerar a cinética individual de cada espermatozóide, ampliando o universo amostral de 26 médias para 5834 espermatozóides. Quanto as sondas fluorescentes, teste MITO, houve a classificação das amostras em oito categorias. Com a técnica exploratória multivariada houve a redução da dimensionalidade obtendo-se três fatores: fator F1, interpretado com um fator relacionado à progressividade do movimento; fator F2, representa um fator de deslocamento espermático sem considerar a direção do movimento; fator F3, diz respeito à energia disponível/ disponibilizada para a movimentação espermática. Houve a determinação dos escores dos coeficientes dos fatores, agrupando as amostras em 9 sub-populações, com características qualitativas distintas. Com o uso da análise estatística multivariada do sêmen congelado ovino foi possível determinar no sistema CASA diferenças fisiológicas e cinemáticas das sub-populações associada a combinação de sondas fluorescentes, havendo analogia entre parâmetros do sistema CASA e teste MITO.

Palavras chave: sub-população espermática, criopreservação do sêmen de carneiros, análise computadorizada do movimento espermático (CASA), atividade mitocondrial, sondas fluorescentes

RANKING/GROUPING OF SANTA INÊS RAM FROZEN SEMEN ANALYZED BY CASA AND FLUORESCENT PROBES LEAD THROUGH THE MULTIVARIATE STATISTICS ANALYSIS

ABSTRACT

The cryopreservation process causes several alterations in semen quality, reducing fertility. New evaluations of sperm motility have been searched, such as the sperm subpopulations analysis by computer-assisted motility assessments (CASA). Fluorescent probes have been studied to evaluate spermatozoon integrity, supplying functional information of the

¹ Prof. Aux. Morfologia Veterinária, Universidade Federal de Goiás - Campus Jataí.

² Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, FMVZ - UNESP Botucatu.

spermatozoa. The aim of this study was to optimize the CASA system in combination with fluorescent probes as a new method of evaluation of the qualitative parameters of the frozen semen of rams. Twenty-six frozen semen samples were evaluated by CASA and MITO Test. The cluster analysis was used with the VARIMAX rotation method and the grouping analysis was performed with Ward's method. The individual kinetics of each spermatozoon was considered for the analysis, extending samples from 26 averages to 5834 spermatozoa. For the MITO test, the samples were grouped into eight categories. The multivariate exploring technique pointed out reduction of the dimensionality, leading to three factors: F1 factor interpreted as a factor related to the forward movement; F2 factor represents a factor of sperm displacement without considering the movement direction; F3 factor means the energy available for the sperm displacement. The determination of score coefficients of the factors was determined by grouping the samples into 9 subpopulations, with distinct qualitative characteristics. With the use of the multivariate statistics analysis of the frozen semen of the rams, it was possible to determine physiological and kinematics differences of the subpopulations associated to the fluorescent probes in the CASA system, with correlations between the CASA system and the MITO test.

Keywords: sperm subpopulation, cryopreservation of ram semen, computer-assisted semen motility analysis (CASA), mitochondrial activity, fluorescent probes

CATEGORIZACIÓN DE SEMEN CONGELADO DE CARNEROS SANTA INÉS SOMETIDOS AL ANÁLISIS CASA Y MARCADORES FLUORESCENTES POR MEDIO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIADO.

RESUMEN

El proceso de criopreservación causa una serie de alteraciones en la calidad del semen que lleva a una importante reducción de la fertilidad. Se han buscado nuevas maneras de evaluación del movimiento del espermatozoide, como por ejemplo el análisis de las subpoblaciones de espermatozoides mediante evaluación computarizada de la motilidad, CASA. Los marcadores fluorescentes han sido estudiados para la evaluación de la integridad del espermatozoide, proporcionando información adicional con relación a la función espermática. El objetivo de este trabajo fue optimizar la utilización del sistema CASA en combinación con marcadores fluorescentes como un nuevo método de evaluación de los parámetros cualitativos del semen congelado de carneros. Veintiséis muestras fueron evaluadas por los métodos CASA y MITO. Fue utilizado el sistema de rotación VARIMAX y el método de WARD para análisis de las categorías. Para el examen fue considerada la cinética de cada espermatozoide, ampliando el universo muestral de 26 para 5834 espermatozoides. Con relación a los marcadores fluorescentes y el método MITO, las muestras fueron agrupadas en ocho categorías. Con la técnica exploratoria multivariada hubo reducción de la dimensión a tres factores: factor F1, explicado por un factor relacionado con el movimiento progresivo; factor F2, que representa un factor de dislocación del espermatozoide sin juzgar la dirección del movimiento; factor F3, que significa la energía disponible para la dislocación del espermatozoide. Se determinaron los valores para las clasificaciones, creando 9 subpoblaciones de muestras, con características cualitativas distintas. Con el uso del análisis estadístico multivariado del semen congelado de carnero, fue posible determinar, por el método CASA, diferenciaciones fisiológicas y cinemáticas de las subpoblaciones asociada a las combinaciones de sondas fluorescentes, lo que mostró analogía entre los métodos CASA y MITO.

Palabras clave: subpoblación de esperma, criopreservación del semen de carnero, análisis computadorizada del movimiento de los espermatozoides (CASA), actividad mitocondrial, marcadores fluorescentes

INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen há muito tem sido vista como uma forma de beneficiar a reprodução dos animais de importância agropecuária, além de ser reconhecida como uma ferramenta para a preservação de espécies em perigo de extinção e de auxiliar em programas de infertilidade humana. Entretanto, o processo de criopreservação acarreta uma série de alterações resultando em uma marcante redução da fertilidade (1).

Nos últimos anos, houve uma evolução nas formas de visualização e avaliação do movimento espermático. Os sistemas de análise computadorizado do movimento espermático (CASA), que representam a terceira geração de equipamentos com essa finalidade, propiciaram um salto na maneira de compreender a célula espermática, possibilitando o acompanhamento de uma grande variedade de parâmetros associados à cinética espermática (2). Este tipo de análise não determina somente a motilidade, mas também quantifica características específicas do movimento espermático podendo ainda determinar a presença e a cinética das sub-populações de espermatozoides constituintes da amostra (3, 4).

Contudo ainda há uma subutilização desses sistemas, considerando-se a forma de explorar suas informações fornecidas pelo sistema CASA (4). Esse é um problema existente no sistema CASA, onde o grande número de parâmetros fornecidos, na maioria das vezes, está altamente correlacionado. Isto torna difícil uma avaliação objetiva de quais parâmetros poderiam explicar acuradamente o movimento espermático (4). Entretanto, a quantidade de dados gerados pelo sistema CASA pode ser simplificada, tornando a análise mais informativa. O CASA também foi designado para detectar grupos com grande afinidade de dados, não sendo desprezada sua distribuição na amostra (5).

Com essa nova forma de registro da avaliação pode-se verificar a cinética individual dos espermatozoides, ampliando o conjunto de informações para um grande conjunto de variáveis. Tal ideia vem ganhando espaço na análise de dados dos experimentos com espermatozoides (2-7).

O emprego de sondas fluorescentes vem sendo estudado buscando-se a avaliação da integridade do espermatozoide. Apesar do alto custo, elas podem fornecer informações adicionais da funcionalidade dos espermatozoides. Uma variedade de sondas tem sido utilizadas na análise dos diferentes componentes celulares. Alguns laboratórios empregaram uma combinação de sondas fluorescentes específicas para os diversos domínios espermáticos, estimulando a qualidade do sêmen (8).

OBJETIVO

Frente a isso, tem-se como objetivo otimizar o emprego do sistema de análise computadorizada do movimento espermático pela cinética das sub-populações de espermatozoides em combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de carneiros.

MATERIAL E MÉTODOS

Em vinte e seis partidas de sêmen congelado, pertencentes a 26 carneiros da raça Santa Inês procederam-se as avaliações utilizando-se:

1) Análise Computadorizada do Movimento Espermático¹ (CASA), conforme *setup* recomendado pelo fabricante, dos parâmetros 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; Frequência de Batimentos (Hz) BCF; Retilinearidade (%) STR; Linearidade (%) LIN e Elongação (%) ELONG, segundo Sousa (9).

2) Associação das sondas iodeto de propídeo, aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com o isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e Mito Tracker Green FM– Teste MITO (10) adaptação.

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

A metodologia estatística utilizada foi análise Exploratória de Dados, Estatísticas Descritiva, Gráficos e Técnicas Multivariadas: Análise Fatorial com método de rotação VARIMAX e Análise de Agrupamentos com método de Ward. O software estatístico empregado foi o Minitab, versão 14.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as descongelações, as amostras foram analisadas pelo sistema CASA sendo verificados valores médios, desvios padrão e amplitude de variação dos parâmetros avaliados conforme a Tabela 1.

Para análise dos resultados fornecidos pelo sistema CASA, optou-se por considerar a cinética de cada espermatozóide individualmente. Desta forma, utilizou-se o espermatozóide como variável ampliando o universo amostral de 26 médias para 5834 espermatozóides analisados separadamente quanto aos parâmetros de sua cinética e trajetória.

Vários estudos similares ocorreram em outras espécies: sêmen fresco de cachacos e de gazelas e congelado de gazelas (3, 5); sêmen refrigerado de cachacos (11) e sêmen canino fresco e congelado (12).

Segundo esses autores, apesar de muitos estudos já publicados utilizarem o sistema CASA, alguns resultados mostraram-se desapontadores ou pouco informativos, provavelmente devido a uma análise inapropriada dos dados, os quais são apresentados apenas como médias \pm desvios ou erros padrão, baseando essa análise em uma avaliação paramétrica.

Abaigar et al. (3) valorizaram a avaliação baseada na distribuição bimodal e com alto desvio associada com marcantes extensões dos dados, o que reflete a presença de subpopulações na amostra global. Essas extensões tendem a mascarar os efeitos do tratamento se os parâmetros forem examinados individualmente, devido ao desvio padrão alto não permitir sua detecção por testes baseados apenas na variância.

¹ HTMA-IVOS 12.3 – Hamilton Research - Beverly, MA, USA

Quanto às sondas fluorescentes, determinou-se a classificação do sêmen congelado dos carneiros pelo emprego do teste MITO dentro das oito categorias (Tabela 2).

Tabela 1. Valores médios, desvios padrão e amplitude de variação dos parâmetros da cinética espermática avaliados no sistema computadorizado de análise do sêmen CASA – HTM-IVOS (versão 12,3) das amostras de sêmen congelado de carneiros (n=26)

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

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

Tabela 2. Categorização geral do sêmen congelado de carneiros determinada pela teste MITO

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

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

Com a técnica exploratória multivariada de dados conhecida como Análise Fatorial houve a redução da dimensionalidade dos dados. Seguindo os critérios das raízes latentes maiores que 1 (F1: 4,6; F2: 2,50 e F3: 1,38) e também a porcentagem da variabilidade total dos dados explicada pelos fatores, optou-se por utilizar como dimensionalidade final aquela dada por três fatores com 79% de explicação da variabilidade total (Tabela 3).

As cargas do primeiro fator F1 são positivas e têm valores altos para as variáveis VAP, VSL, STR e LIN, que foi interpretado como um fator relacionado à progressividade do movimento. Para o segundo fator F2, as cargas com sinal negativo, associam as variáveis VCL, ALH e MT, que representam um fator de deslocamento espermático sem considerar a direção do movimento. Para o terceiro fator F3, estão associadas as variáveis BCF, MITO e ELONG, cuja interpretação diz respeito à energia disponível/disponibilizada para a movimentação espermática. A partir desse dado foi realizada a determinação dos escores dos coeficientes dos fatores considerando as variáveis, permitindo determinar a seguir essa relação para cada carneiro, agrupado-os.

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

Tabela 3. Cargas fatoriais e comunalidade, por variável, para fatores não rotacionados e fatores rotacionados pelo método VARIMAX e, variação percentual explicada por meio de cada fator e total.

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

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

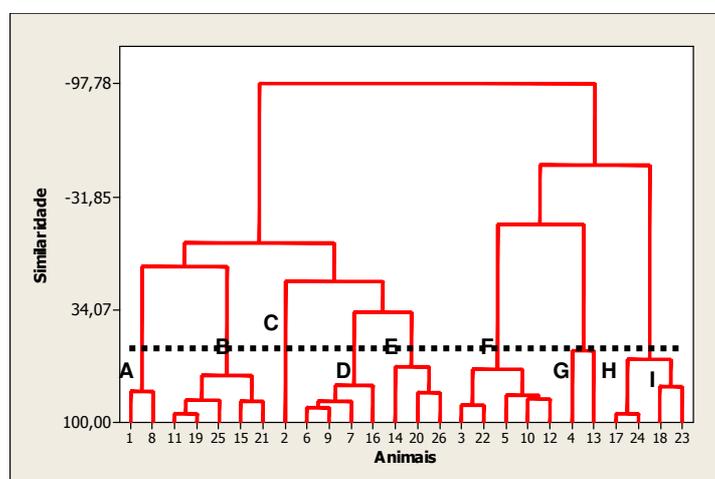


Figura 1. Dendrograma, representação gráfica do processo de agrupamento hierárquico das amostras de sêmen congelado de 26 carneiros da raça Santa Inês, baseado na variabilidade existente, com valor de similaridade máxima igual a 100,00.

Abaigar et al. (3) e Abaigar et al. (5) utilizaram raciocínio semelhante para o agrupamento das populações de espermatozoides frescos de cachacos e gazelas e congelados de gazelas, determinando as sub-populações específicas das amostras. Não houve nessa análise interesse em determinar de qual animal se originaram os espermatozoides, o que não ocorreu em nossa avaliação, visto que as fontes geradoras das amostras de sêmen congelado dos carneiros é que se buscou agrupar.

O sêmen congelado dos carneiros 2, 4 e 13 foi muito diferente do restante dos animais. Desta maneira, abaixo do nível de similaridade dos animais 4 e 13 traçou-se uma linha

horizontal de corte, obtendo assim a formação de 9 grupos distintos denominados A, B, C, D, E, F, G, H, e I.

As amostras provenientes dos animais 2, 4 e 13 formam grupos unitários. Para a amostra do animal número 2 (grupo C), foram encontrados valores baixos nos três fatores. No material dos animais 4 (grupo G) e 13 (grupo H) encontramos valores baixos em progressividade do movimento e disponibilidade de energia, porém apresentam bom deslocamento. As amostras de sêmen congelado dos animais 2, 4 e 13 foram consideradas como *outliers*, fato frequentemente verificado na literatura.

Para os carneiros 1 e 8 (grupo A), encontramos os melhores valores de energia porém fraco em progressividade e mediano em deslocamento. No grupo constituído pelas amostras 11, 19, 25, 15 e 21 (grupo B) encontramos bons valores de progressividade e valores de mediano para baixo em deslocamento e disponibilidade de energia. Para os grupos 6, 7, 9 e 16 (grupo D) verificam-se baixos valores em energia disponível e progressividade e valores medianos em deslocamento espermático. O grupo dos animais 14, 20 e 26 (grupo E) apresenta baixos valores de energia disponível e deslocamento, sendo o carneiro 14 fraco em direção, e os demais animais com valores medianos para progressividade. Os grupos 3, 5, 10, 12 e 22 (grupo F) apresentaram altos valores de progressividade e deslocamento, porém valores ruins em disponibilidade de energia.

Em estudo com sêmen de cães (8), foi levantada a hipótese de que os agrupamentos possuidores dos maiores valores de velocidade e com movimento mais progressivo, seriam considerados os com maior potencial para a fertilização.

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

Abaigar et al. (3) obtiveram três agrupamentos dos espermatozoides frescos de cachasos sendo que no grupo 1 foram verificados espermatozoides com alto movimento progressivo (alto VSL) e vigorosa ação flagelar (alto BCF). No grupo 2, espermatozoides com movimento ativo (alto VCL) mas com redução significativa da progressão (baixo VSL e alto ALH). No grupo 3 houve provavelmente células lentas e degeneradas devido a todos os parâmetros dos grupos 1 e 2 estarem baixos. Em um estudo com o sêmen refrigerado de cachasos foram verificadas três sub-populações, sendo em uma delas os espermatozoides mais rápidos, com baixa linearidade. Na outra sub-população, foram agrupados 90% dos espermatozoides, sendo estes caracterizados por baixa velocidade, alta progressividade, movimento pouco ondulante, sendo o valor de BCF similar as demais sub-populações. A terceira sub-população não apresentou movimento linear (alto ALH), contudo as células possuíam alto valor de VAP, indicando espermatozoides muito ativos (12).

CONCLUSÕES

Avaliações clássicas dos dados do sistema CASA mostram que a distribuição normal raramente é encontrada. Distribuições bimodais e distorcidas geralmente ocorrem em conjunto com marcantes amplitudes de variação as quais refletem a presença de sub-populações distintas dentro da amostra.

Tais amplitudes tendem a mascarar os efeitos de tratamento se os parâmetros analisados forem avaliados individualmente devido aos desvios padrão serem muito altos para permitir sua detecção pelos testes estatísticos. Esse problema é causado parcialmente pela existência de sub-populações onde mesmo que algumas possam ser afetadas pelo tratamento, outras não respondem podendo confundir as tentativas de análise por interferirem nas médias.

Apesar de não ser ainda muito empregado, o método de análise multivariada das sub-populações espermáticas evidenciou aspectos interessantes dos experimentos, situação não constatada com a análise estatística “clássica” baseada em médias (13).

Com o uso da análise estatística multivariada do sêmen congelado ovino, foi possível determinar no sistema de análise computadorizada do sêmen que o parâmetro da cinética espermática BCF (frequência de batimentos) expressa analogia com as características obtidas na avaliação em microscopia epifluorescente com o teste MITO.

A identificação das diferenças fisiológicas e cinemáticas das sub-populações associada a combinação de sondas fluorescentes na avaliação da fertilidade do sêmen congelado dos carneiros poderá auxiliar na discussão de fatores que limitam a fertilidade do sêmen congelado de ovinos.

Diante do exposto, abre-se uma nova perspectiva da avaliação da cinética espermática, visto que a detecção e a compreensão das sub-populações poderá fornecer importantes resultados para a monitorização dos espermatozoides, principalmente quando associada a testes de fertilidade. Desconsiderar a existência e, principalmente, os efeitos biológicos da presença das sub-populações espermáticas nos resultados médios torna-se temerário devido a imprecisões na obtenção de resposta aos estímulos propostos nos ensaios de criopreservação do sêmen.

REFERÊNCIAS

1. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:481-92.
2. Amann RP, Katz DF. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl.* 2004;25:317-25.
3. Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, Del Barrio G. Sperm subpopulations in boar (*Sus Scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod.* 1999;60:32-41.
4. Quintero-Moreno A, Miró J, Teresa Rigau A, Rodríguez-Gil JE. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology.* 2003;59:1973-90.
5. Abaigar T, Cano M, Pickard AR, Holt WV. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction.* 2001;122:265-73.
6. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 2002;57:149-79.
7. Mortimer ST, Maxwell WC. Effect of medium on kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction.* 2004;127:285-91.
8. Meseguer M, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. *J Assist Reprod Genet.* 2004;21:445-51.
9. Sousa DB. Viabilidade do sistema Equitainer[®] na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2002.

10. Celeghini ECC. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura de cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2005.
11. Quintero-Moreno A, Teresa Rigau A, Rodríguez-Gil JE. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*. 2004;61:673-90.
12. Nuñez-Martínez I, Moran JM, Peña FJ. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod Domest Anim*. 2006;41:408-15.
13. Martínez-Pastor F, García-Macias V, Alvarez M, Herraez P, Anel L, Paz P. Sperm subpopulation in Iberian Red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biol Reprod*. 2005;72:316-27.

Recebido em: 15/08/2012

Aceito em: 04/10/2013