LEONARDO BATISSACO

**Criopreservação do sêmen ovino com incorporação de colesterol por
ciclodextrina**

Pirassununga

2014

LEONARDO BATISSACO

**Criopreservação do sêmen ovino com incorporação de colesterol por
ciclodextrina**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Reprodução Animal
da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de Mestre em
Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho
Celeghini

De acordo: _____

Profa. Dra. Eneiva Carla
Carvalho Celeghini

Pirassununga

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3033
FMVZ

Batissaco, Leonardo
Criopreservação do sêmen ovino com incorporação de colesterol por ciclodextrina /
Leonardo Batissaco. – 2014.
112 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini.

1. Carneiro. 2. Criopreservação. 3. Ciclodextrina. 4. Colesterol. 5. Espermatozoide.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Criopreservação do sêmen ovino com incorporação de colesterol por ciclodextrina", protocolado sob o nº 2679/2012, utilizando 06 (seis) carneiros, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/6/2012.

We certify that the Research "Cryopreservation of ram semen with incorporation of cholesterol by cyclodextrin", protocol number 2679/2012, utilizing 06 (six) rams, under the responsibility Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 6/20/2012.

São Paulo, 7 de outubro de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de
Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de
Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BATISSACO, Leonardo

Título: Criopreservação do sêmen ovino com incorporação de colesterol por ciclodextrina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico todo esse trabalho a minha família que sempre foi minha base, meu apoio e que sempre me apoiaram na busca do conhecimento, da minha formação e da minha felicidade, sou eternamente grato.

Agradecimentos

Á **Deus**, por sempre ter iluminado meu caminho, me orientado, me acalmado nas horas de desespero e por sempre me mostrar que o caminho que ele me planejou, por mais difícil que seja sempre valerá a pena se for trilhado com amor e ao lado daqueles que se ama;

Á minha mãe, **Maristela**, por ter criado mais que um filho, ter criado a o homem que sou hoje, devo tudo a você, todos os ensinamentos, todas as conversas, as broncas, o amor que você dedicou a mim por todos esses anos, sou muito sortudo de ter você como mãe, como base, como amiga, obrigado, por tudo, te amo;

Á meu pai, **Alderico**, por ser hoje e sempre meu herói, meu exemplo de vida, meu amigo, por ter me ensinado o valor da vida, a sempre buscar minha felicidade, e sempre fazer de tudo, mesmo fora do alcance, para me ajudar a conquistar tudo na vida, sou muito grato por tudo desde as broncas até as conversas sobre a vida, muito obrigado, te amo;

Á minha irmã, **Marina**, por ter sido sempre minha companheira desde as brigas de irmão que acabavam em risadas, até os conselhos, as brincadeiras, o companheirismo, as felicidades divididas, você é sempre vai ser minha melhor amiga, muito obrigado, te amo;

Á meu avô (*in memoriam*), **Francisco**, que mesmo sem saber, sempre me incentivou a fazer veterinária, sempre me envolveu com suas histórias da fazenda, sempre me ensinou o carinho pelos animais e sempre me sorriu com um sorriso orgulhoso, gostaria que você estivesse entre nós para poder dividir essa realização com você;

Á **Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini**, minha orientadora, praticamente desde a época da graduação, que sempre me guiou, me mostrou o caminho da ciência e sempre despertou meu interesse na veterinária, você não só me ajudou muito academicamente, mas também sempre me orientou na minha vida pessoal, me incentivou e motivou a sempre dar o melhor de mim, sempre irei admirar a sua curiosidade científica, sua ética e a empolgação com que você sempre vê a ciência, obrigado por ter aberto as portas para mim, por acreditar em mim e pela sua amizade, sou eternamente grato a você;

Ao **Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda**, muito obrigado pelos conselhos, pelas risadas no corredor, pela ajuda com os animais no começo e por abrir as portas do Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) para a realização de nossas análises;

Ao **Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade**, obrigado pelos conselhos, pelas dicas no experimento, pelas risadas, por sempre ensinar a buscar mais, a pensar a frente, por ceder suas orientadas para me ajudar no experimento e por ter aberto as portas do Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES) que foi de fundamental importância na realização desse experimento;

Á **Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes**, pela orientação na iniciação científica e no estágio obrigatório na época da graduação, por ter sido grande parte da minha formação, pela ajuda tanto profissional como pessoal, e pela amizade;

Á todos os outros professores do VRA de Pirassununga **Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi (Kiky)** e **Prof. Drs. Ed Hoffmann e Mário Binelli** e aos professores do VRA de São Paulo **Profs. Drs. Mayra Elena Ortiz D'Avilla Assumpção, José Antonio Visintin Camila Infantsi Vannucchi, Clair Motos de Oliveira, Claudio Alvarenga de Oliveira, Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, Pietro Sampaio Baruselli, Ricardo José Garcia Pereira e Marcílio Nichi** pelos conselhos, pela convivência e pela amizade;

Aos funcionários do CBRA, **Clayton, João, Márcio, Rildo (Negão), Zé Maria, Alexandra e Sandra**, pela convivência, pela ajuda sempre com um sorriso no rosto e pela amizade;

Às funcionárias do VRA (SP), **Harumi, Roberta e Thais** por sempre ajudarem tão prontamente e com tanto carinho um pobre pós graduando que sempre precisava das coisas urgentemente e principalmente pela amizade;

As pessoas que atuaram ativamente em meu experimento; **Doci e Mari**, que suportaram varias sessões de coleta, congelação e análise do sêmen de semana ou fim de semana, chuva ou sol; ao **Ticiano** pela ajuda com a idéia do projeto e preparação da ciclodextrina; aos alunos de iniciação científica **Agarose e Robertinho** meus pequenos flangos que estavam sempre a postos para ajudar, durante todo o experimento, sempre com incrível determinação; A chilena **Rhommy** pela ajuda no citometro tão em cima da hora; ao **Kleber** pela ajuda com as análises estatísticas, com as intermináveis tabelas, pelas opiniões e pelos conselhos; A **Simone** pela ajuda com as análises do colesterol e pela paciência comigo no laboratório; obrigado a todos pela ajuda e pela amizade;

Aos outros membros da nossa equipe no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução (LEPPaR), **Bruna**, amiga incondicional, **Shirleizinha**, colombianinha do meu coração, **Guapa**, minha irmãzinha equatoriana, **Roberta**, amigona japa e **Felipe**, o figura, que mesmo não participando ativamente do experimento sempre me ajudaram, me aconselharam e fizeram o dia a dia mais agradável, obrigado pela amizade;

Aos outros colegas da pós graduação **Renata, Henrique, Bu, Gisele, Gato Seco, Moana, Milena, Roney, Everton, Guilherme, Veerle, Tiago, Mariana, Sara, Angela, Estela, Milton, Arroz, Ju Mega, Ju Diniz, Mayra e Dani**, obrigado a todos pela convivência, pelas risadas e pela amizade.

Á meus amigos da Faculdade e da família CFH **Maku, Libidão, Xacrete, Larissão, Gordinho, Bebezão, Carol, Bada, Breuba, Giserda, Bogueira, Rica, Tô e Fedezão**, pelas histórias e pela amizade que ira durar para sempre com certeza;

Á meus amigos de São Carlos **Biga, Zé, Breno, Romeu, Cão e Gigli** obrigado pela amizade, pelas risadas, pelo companheirismo e por sempre me ouvir falar tanto de carneiros;

Á **Heloisa Feliciani**, apesar de não estarmos mais juntos seria injusto não te agradecer, obrigado por todo o companheirismo, paciência, motivação, amizade e amor que você me deu todos esses anos e principalmente por todo o apoio que você me deu no começo do mestrado e durante toda a graduação, você vai estar para sempre no meu coração;

As pessoas que passaram pela minha vida, **Moyses, Suzana, Paulo e Adelaide**, obrigado pela amizade, pelos ensinamentos e por terem passado pela minha vida, agradeço a vocês de coração;

Agradeço a FAPESP pela bolsa e pelo auxílio que me foram concedidos, permitindo a realização desse projeto (processo nº 2012/09927-7 e 2012/00040-0)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

BATISSACO, L. **Criopreservação do sêmen ovino com incorporação de colesterol por ciclodextrina.** [Criopreservation of ram semen with colesterol loaded cyclodextrin]. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

A preocupação com a qualidade do sêmen ovino congelado tem sido motivo de muitas pesquisas, principalmente pela dificuldade da transposição cervical durante a inseminação artificial. Contudo, a inseminação intra-cervical é frequentemente usada em ovinos e resulta em redução da fertilidade com o uso do sêmen congelado. Neste sentido, esse estudo foi dividido em dois experimentos. No 1º experimento foi verificado o potencial da ciclodextrina pré-carregada com colesterol como aditivo ao diluidor na proteção da cinética espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial, capacitação espermática e produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) em espermatozoides criopreservados ovinos. Cinco ejaculados de seis carneiros (n = 30) foram divididos em três tratamentos: apenas diluidor (CON); diluidor + colesterol incorporado a ciclodextrina (CLC + CHO); e diluidor + ciclodextrina pura (CLCP). Após a diluição (50×10^6 espermatozóides/mL), o sêmen foi envasado em palhetas, identificado e criopreservado utilizando um sistema automatizado. Duas palhetas da mesma partida de cada tratamento foram descongeladas (a 37°C durante 30 segundos) e analisadas quanto motilidade (CASA), morfologia dos espermatozoides (DIC), integridade do plasma (PI-H342) e acrossomal (FITC-PSA) membranas, potencial mitocondrial (JC-1), produção de radicais livres (CellRox), peroxidação lipídica (BODIPY) e fluidez da membrana celular (merocianina 540). As comparações entre os grupos foram analisadas pelo PROC MIXED do SAS e o efeito de grupo foi detectado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ou pela estatística não paramétrica de ordem (Kruskal-Wallis), quando era necessário. No 2º experimento os mesmos ejaculados foram divididos por congelabilidade baseados na motilidade total pós-descongelação (MTPD) e na porcentagem de redução na motilidade total (%RMT) quando comparados o sêmen *in natura* e o sêmen pós-descongelação (somente diluidor), sendo divididos nos grupos alta (MTPD > 60% e %RMT < 40%), intermediária (60% > MTPD > 40% e 60% > %RMT > 40%) e baixa (MTPD < 40% e %RMT > 60%) congelabilidade. Foram analisados os tratamentos CON e CLC+CHO dentro de cada animal e de cada grupo quanto a motilidade (CASA), a integridade das membranas plasmática (PI-H342) e acrossomal (FITC-PSA), potencial mitocondrial (JC-1), peroxidação lipídica (BODIPY) e fluidez da membrana celular (merocianina 540). As comparações foram realizadas por análise

de variância (ANOVA) em arranjo fatorial 3X3 (Tratamento CLC+CHO, CON e *in natura* X grupos alta, intermediária e baixa congelabilidade), as comparações entre os grupos foram analisadas pelo PROC MIXED do SAS e o efeito de grupo foi detectado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ou pela estatística não paramétrica de ordem (Kruskal-Wallis), quando era necessário. No 1º experimento o tratamento CLC+CHO se mostrou mais eficaz em preservar os parâmetros de motilidade, integridade de membranas e potencial mitocondrial quando comparado aos demais tratamentos. O grupo CLCP mostrou queda nos parâmetros de motilidade, integridade de membrana, potencial mitocondrial, mostrando, com isso, uma queda na preservação espermática. No 2º experimento observou-se que o tratamento CLC+CHO mostrou maior grau de preservação para motilidade total e progressiva, células rápidas, preservação de membranas plasmática e acrossomal e potencial mitocondrial quando comparado ao CON. Esse efeito teve maior significância nos grupos de baixa e intermediária congelabilidade, não sendo tão expressivo no grupo de alta. Pode-se concluir com esse estudo que o tratamento com ciclodextrina acrescida de colesterol contribui para uma melhor preservação dos parâmetros espermáticos do sêmen ovino, principalmente em animais apresentando baixa congelabilidade, contudo não apresenta diferença em ejaculados de alta congelabilidade.

Palavras-chave: Carneiro. Criopreservação. Ciclodextrina. Colesterol. Espermatozoide.

ABSTRACT

BATISSACO, L. **Criopreservation of ram semen with cholesterol loaded cyclodextrin.** [Criopreservação do sêmen ovino com incorporação de colesterol por ciclodextrina]. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Frozen ram semen has been the subject of many researches, mainly due to the difficulty of cervical transposition during artificial insemination. However, intra-cervical insemination in sheep is often used, resulting in reduced fertility with the use of frozen semen. To this end, this study was divided into two experiments. In the first experiment was verified the potential of cyclodextrin loaded with cholesterol as an additive to the extender in the protection of sperm kinetics, integrity of plasmatic and acrosomal membranes, mitochondrial function, sperm capacitation and production of reactive oxygen species (ROS) in cryopreserved sheep sperm. Five ejaculates from six rams ($n = 30$) were divided into three treatments: only extender (CON); extender + cyclodextrin loaded with cholesterol (CLC + CHO); and extender + pure cyclodextrin (CLCP). After dilution (50×10^6 spermatozoa/mL), semen was stored in straws, identified and cryopreserved using an automated system. Two straws from each ejaculate and treatment were thawed (at 37°C for 30 seconds) and analyzed for motility (CASA), morphology of spermatozoa (DIC), plasmatic (PI-H342) and acrosomal (FITC-PSA) membrane integrity, mitochondrial potential (JC-1), production of free radicals (CellRox), lipid peroxidation (BODIPY) and cell membrane permeability (Merocyanine 540). Comparisons between groups were analyzed using PROC MIXED of SAS and the effect of group was detected by Tukey ($p < 0.05$) or by the order of nonparametric statistics (Kruskal-Wallis) test, when necessary. In the 2nd experiment the same ejaculates were divided by freezability based on the total post-thaw motility (TPTM) and the percentage of reduction in total motility (%RTM) when compared fresh and post-thaw semen (only extender), and divided into the groups: high ($\text{TPTM} \geq 60\%$ and $\% \text{RTM} \leq 40\%$), intermediate ($60\% > \text{TPTM} > 40\%$ and $60\% > \% \text{RTM} > 40\%$) and low ($\text{TPTM} \leq 40\%$ and $\% \text{RTM} \geq 60\%$) freezability. CON and CLC + CHO treatments were analyzed within each animal and each group for motility (CASA), plasmatic (PI-H342) and acrosomal (FITC-PSA) membrane integrity, mitochondrial potential (JC-1), lipid peroxidation (BODIPY) and cell membrane permeability (Merocyanine 540). Comparisons were performed by analysis of variance (ANOVA) with a factorial arrangement 3×3 (groups CLC+CHO, CON and fresh X groups high, medium and low freezability),

comparisons between groups were analyzed using PROC MIXED of SAS and the group effect was detected by the Tukey test ($p < 0.05$) or non statistical order parametric (Kruskal-Wallis), when necessary. In the first experiment, CLC + CHO treatment was more effective in preserving the parameters of motility, membrane integrity, and mitochondrial potential compared to other treatments. The CLCP group showed a fall in the parameters of motility, membrane integrity, mitochondrial potential, showing thereby a decrease in sperm preservation. In the 2nd experiment, it was observed that the treatment CLC + CHO showed greater preservation for total and progressive motility, rapid cell preservation, plasmatic and acrosomal membranes and mitochondrial potential when compared to CON. This effect was most significant in the groups of low and intermediate freezability, not being as significant in the group of high freezability. We can conclude from this study that treatment with cyclodextrin loaded with cholesterol contributes to better preservation of sperm parameters in ram semen, especially in animals displaying low freezability, however there was no difference in the high freezability group.

Keywords: Ram. Cryopreservation. Cyclodextrin. Cholesterol. Sperm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo da membrana lipídica celular e seus componentes; representação do colesterol (20%) na membrana (relação fosfolipídeo:colesterol aproximadamente 4:1).....	27
Figura 2 -	Fluxograma do primeiro experimento.....	38
Figura 3 -	Fluxograma do segundo experimento.....	39
Figura 4 -	Imagem gerada da tela do programa de análise computadorizada do sêmen (CASA) Sperm Class Analyzer (SCA).....	43
Figura 5 -	Espermatozoides ovinos corados pela técnica da tripla coloração descrita por Celeghini et al. (2010) de avaliação das membranas plasmáticas, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial.....	45
Figura 6 -	Espermatozoides ovinos corados pela sonda CellROX® e Hoescht 33342.....	46
Figura 7 -	Gráfico gerado pelo citometro de fluxo a partir do software FACSDiva 6.1, utilizando as sondas para integridade da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides ovinos pós descongelação.....	50
Figura 8 -	Gráfico gerado pelo citometro de fluxo a partir do software FACSDiva 6.1, utilizando a sonda para estresse oxidativo (BODIPY) dos espermatozoides ovinos pós descongelação.....	52
Figura 9 -	Gráficos gerado pelo citometro de fluxo a partir do software FACSDiva 6.1, utilizando a sonda para capacitação dos espermatozoides ovinos pós descongelação.....	54
Figura 10 -	Média $\pm$ erro padrão das características de integridade de membranas plasmática e acrossomal e potencial mitocondrial do sêmen ovino in natura e pós-descongelação nos grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor), CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol), e CLCP (diluidor acrescido de ciclodextrina pura).....	58

Figura 11 -	Média $\pm$ erro padrão das características de peroxidação lipídica do sêmen pós-descongelção entre os grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor), CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol), e CLCP (diluidor acrescido de ciclodextrina pura).....	60
Figura 12 -	Média $\pm$ erro padrão das características de fluidez da membrana, indicativo de capacitação pela citometria de fluxo do sêmen pós-descongelção entre os grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor), CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol), e CLCP (diluidor acrescido de ciclodextrina pura).....	61
Figura 13 -	Imagem gerada da tela do programa de análise computadorizada do sêmen (CASA) Sperm Class Analyzer (SCA).....	70
Figura 14 -	Espermatozoides ovinos corados pela técnica da tripla coloração descrita por Celeghini et al. (2010) de avaliação das membranas plasmáticas, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial.....	71
Figura 15 -	Gráfico gerado pelo citometro de fluxo a partir do software FACSDiva 6.1, utilizando as sondas para integridade da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides ovinos pós descongelção.....	75
Figura 16 -	Gráfico gerado pelo citometro de fluxo a partir do software FACSDiva 6.1, utilizando a sonda para estresse oxidativo (BODIPY) dos espermatozoides ovinos pós descongelção.....	77
Figura 17 -	Gráficos gerado pelo citometro de fluxo a partir do software FACSDiva 6.1, utilizando a sonda para capacitação dos espermatozoides ovinos pós descongelção.....	79
Figura 18 -	Médias $\pm$ erro padrão das características espermáticas de motilidade (subjetiva e CASA) avaliadas em ejaculados de carneiros em diferentes grupos de congelabilidade (alta, intermediária e baixa) e diferentes tratamentos (sêmen in natura, sêmen pós-descongelção dos grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor) e CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol)).....	83
Figura 19 -	- Médias ($\pm$ E.P.M.) das características de peroxidação lipídica e capacitação espermática avaliadas em ejaculados de carneiros em diferentes grupos de congelabilidade (alta, intermediária e baixa) e diferentes tratamentos (sêmen pós-descongelção dos grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor) e CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol)).....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Média $\pm$ erro padrão das características de vigor (0-4) e motilidade (MS, %) avaliados subjetivamente e características avaliadas pelo programa Sperm Class Analyser (SCA).....	57
Tabela 2 -	Média $\pm$ erro padrão das características de morfologia espermática do sêmen ovino quanto a porcentagem de defeito maiores, menores e totais.....	57
Tabela 3 -	Média $\pm$ erro padrão das características de estresse oxidativo, observado pelo CellRox, do sêmen ovino in natura e pós-descongelação nos grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor), CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol), e CLCP (diluidor acrescido de ciclodextrina pura).....	59
Tabela 4 -	Parâmetros utilizados para a divisão dos grupos de congelabilidade.....	68
Tabela 5 -	Médias $\pm$ erro padrão das características de movimento espermático avaliados pelo CASA de ejaculados de carneiros em diferentes grupos de congelabilidade (alta, intermediária e baixa) e diferentes tratamentos (sêmen in natura, sêmen pós-descongelação dos grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor) e CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol)).....	84
Tabela 6 -	Médias $\pm$ erro padrão das características espermáticas de membranas avaliadas em ejaculados de carneiros em diferentes grupos de congelabilidade (alta, intermediária e baixa) e diferentes tratamentos (sêmen in natura, sêmen pós-descongelação dos grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor) e CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol)).....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
μM	micromolar
μm	micrômetro
%RMT	Porcentagem de redução na motilidade total
Å	Angstrom
AI	membrana acrossomal íntegra
ALH	amplitude lateral de cabeça
AR	reação acrossomal
ATP	adenosina trifosfato
BCF	frequência de batimento
BODIPY	C11-BODIPY® ^{581/591}
C-AMP	adenosina monofosfato cíclico
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
cm	centímetro
CLC	Ciclodextrina
CLC+CHO	Ciclodextrina acrescida de colesterol
CLCP	Ciclodextrina pura
CON	Controle
DNA	ácido desoxirribonucleico
DMSO	dimetil sulfóxido
ECC	escore de condição corporal
EROS	espécies reativas de oxigênio
FITC-PSA	aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada com isotiocianato de fluoresceína
H33342	Hoechst 33342
Hz	Hertz
JC-1	iodeto de 5,5', 6,6'-tetra-cloro-1,1', 3,3'-tetrametilbenzimidazolil-carbocianina
Kg	quilogramas
LIN	linearidade
M540	merocianina 540

M β CD	Metil- β -ciclodextrina
mg	miligrama
min	minuto
mM	milimolar
mL	mililitro
MPROG	motilidade progressiva
MT	motilidade total
MTPD	Motilidade pós descongelação
nm	nanômetro
OPG	ovos por grama de fezes
p	probabilidade
PI	iodeto de propídeo
PIAIA	membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial
ppm	partes por milhão
PROC	procedimento
r	coeficiente de correlação
R ²	coeficiente de determinação
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SCA	Sperm Class Analyser
SPTZ/mL	espermatozoides por mililitro
STR	retilinearidade
TALP	Tyrode's albumina lactato piruvato
TALPm	Tyrode's albumina lactato piruvato modificado
UI	unidade internacional
VAP	velocidade média do trajeto
VCL	velocidade curvilínea
VSL	velocidade progressiva

LISTA DE SÍMBOLOS

-	menos
%	por cento
/	por
:	para (1:1)
<	menor
>	maior
≥	maior ou igual
≤	menor ou igual
=	igual
®	marca registrada
°C	graus Celsius
α	alfa
β	beta
γ	gama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 O ESPERMATOZOIDE E A CRIOPRESERVAÇÃO.....	25
2.1.2 Função do colesterol na criopreservação	27
2.2 CAPACITAÇÃO E HIPERMOTILIDADE ESPERMÁTICA.....	28
2.2.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS) na capacitação e criopreservação.....	29
2.3 CICLODEXTRINA E COLESTEROL.....	30
2.4 AVALIAÇÕES DO SÊMEN OVINO	31
2.4.1 Membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial.....	31
2.4.2 Espécies reativas de oxigênio (ROS)	32
2.4.3 Capacitação espermática	33
2.4.4 Análise espermática computadorizada (Sperm Class Analyser-SCA)	34
2.4.5 Citometria de fluxo.....	35
3 HIPÓTESES	36
4 OBJETIVOS	37
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
5.1 EXPERIMENTO 1	38
5.2 EXPERIMENTO 2	39
6 CAPÍTULO 1 - O uso do colesterol incorporado a ciclodextrina preserva as características de motilidade, integridade de membranas e potencial mitocondrial	40
6.1 INTRODUÇÃO.....	40
6.2 MATERIAL E MÉTODO	41
6.2.1 Animais	41
6.2.2 Divisão dos Grupos Experimentais	41
6.2.3 Colheita e Análises do Sêmen Pré-criopreservação.....	42
6.2.4 Análise Subjetiva e Computadorizada do Sêmen	42
6.2.5 Análises da membrana plasmática, acrossoma e potencial mitocondrial	43
6.2.6 Análise da produção de EROS	45
6.2.7 Preparação da Ciclodextrina	46
6.2.8 Criopreservação do Sêmen	47

6.2.9 Análise do Sêmen Pós-criopreservação	48
6.2.9.1 Avaliações espermáticas por meio da técnica de citometria de fluxo	48
6.2.9.1.1 Avaliação das membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo.....	49
6.2.9.1.2 Avaliação da produção de EROS por citometria de fluxo.....	50
6.2.9.1.3 Avaliação da fluidez da membrana plasmática por citometria de fluxo.....	53
6.2.9.2 Avaliação do potencial mitocondrial e estresse oxidativo por Microscopia de Epifluorescência	55
6.2.10 Análise Estatística.....	55
6.3 RESULTADOS	56
6.4 DISCUSSÃO	61
6.4.1 Ciclodextrina incorporada ao colesterol contribui para preservar a motilidade espermática.....	61
6.4.2 O uso da ciclodextrina incorporada ao colesterol não influencia a morfologia espermática.....	62
6.4.3 A ciclodextrina incorporada ao colesterol confere melhor proteção às membranas e aumenta o potencial mitocondrial.....	63
6.4.4 O influxo de colesterol não influencia o estresse oxidativo	64
6.4.5 A ciclodextrina incorporada ao colesterol não influência no grau de desordem de membrana	65
6.4.6 Ciclodextrina pura e a retirada do colesterol	65
6.5 CONCLUSÃO.....	66
7 CAPÍTULO 2 - A adição de colesterol incorporado a ciclodextrina melhora a criopreservação de sêmen ovino de baixa congelabilidade	67
7.1 INTRODUÇÃO.....	67
7.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
7.2.1 Delineamento.....	68
7.2.2 Colheita e Análises do Sêmen Pré-criopreservação.....	69
7.2.2.1 Análise Subjetiva e Computadorizada do Sêmen.....	69
7.2.2.2 Análises da membrana plasmática, acrossoma e potencial mitocondrial.....	70
7.2.3 Preparação da Ciclodextrina.....	72
7.2.4 Criopreservação do Sêmen	73
7.2.5 Análise do Sêmen Pós-criopreservação	73
7.2.5.1 Avaliações espermáticas por meio da técnica de citometria de fluxo	74
7.2.5.1.1 Avaliação das membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo.....	74

7.2.5.1.2 Avaliação da produção de EROS por citometria de fluxo.....	76
7.2.5.1.3 Avaliação da fluidez da membrana plasmática por citometria de fluxo.....	78
7.2.5.2 Avaliação do potencial mitocondrial por Microscopia de Epifluorescência.....	80
7.2.6 Análise Estatística.....	80
7.3 RESULTADOS	81
7.4 DISCUSSÃO	88
7.5 CONCLUSÃO.....	90
8 CONSIDERAIS FINAIS.....	91
REFERÊNCIAS	92
ANEXOS	105

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a qualidade do sêmen ovino congelado tem sido motivo de muitas pesquisas, visando o aumento da taxa de prenhez em ovelhas após a inseminação artificial pela via cervical. Esta técnica torna o emprego do sêmen mais acessível, reduzindo os custos e a necessidade de mão-de-obra requerida pela inseminação intra-uterina, utilizando a laparoscopia (MORAES, 1998). Contudo, a inseminação cervical em ovinos é frequentemente limitada pela baixa fertilidade, principalmente quando utilizado o sêmen congelado (DONAVAN et al., 2004).

Há uma significativa influência do inseminador, do tipo de sêmen (fresco ou congelado), mas principalmente da raça das ovelhas na taxa de fertilização do rebanho, quando se opta pelo uso de sêmen congelado em programas de inseminação cervical (PINHEIRO, 2009).

Cada espécie possui composição seminal distinta, havendo ainda peculiaridades quanto a composição e sensibilidade das membranas espermáticas ao processo de criopreservação (BICUDO et al., 2005). A mudança de temperatura durante a refrigeração da célula altera as propriedades físicas de todas as membranas celulares, sendo que a adição do crioprotetor penetrante altera o volume celular. A congelação altera a estrutura e o volume das membranas, o armazenamento representa o estado de dormência celular, e por fim quando a célula é descongelada, o reaquecimento e a retirada do meio com diluidor de armazenagem promovem o processo inverso, com recuperação e expansão das membranas (CELEGHINI, 2005).

Foram constatados alguns efeitos mais concretos impostos pela congelação sobre os espermatozoides ovinos, caracterizados por modificação da atividade respiratória, criocapacitação em larga escala, modificação da interação com as células da tuba uterina e suspeita-se que pode haver pequeno incremento nas taxas de mortalidade de embriões obtidos com espermatozoides criopreservados (BICUDO et al., 2005). A diminuição da motilidade progressiva ocasionada pelo processo de congelação/descongelação resulta em um decréscimo da capacidade do espermatozoide em penetrar a cérvix (PINHEIRO, 2009). O colesterol tem múltiplos efeitos sobre as membranas plasmática e acrossomal, incluindo estabilização, redução da permeabilidade, o que melhora as características morfológicas de membrana permitindo interações célula-célula, que influencia a transição de fase da membrana, proporcionando microambientes adequados (química e/ou física) para proteínas associadas, e servindo como um antioxidante (CROCKETT 1998). Também é relatado que o processo de criopreservação

pode levar à criocapacitação do sêmen equino (ANDRADE et al., 2012), suíno (KUMARESAN et al., 2011), bubalino (KADIRVEL et al., 2009; KUMAR et al., 2014) e ovino (GILLAN et al., 1997; ROVEGNO, et al., 2013).

As ciclodextrinas (CDs) são uma família de oligômeros cíclicos de glicose que têm uma superfície polar e uma cavidade hidrófoba com um diâmetro de 5-8 Å, que pode acomodar pequenas moléculas. CDs são nomeadas de acordo com o número de unidades de glicose presente na sua estrutura: α , β ou γ -CLC se contiverem seis, sete ou oito anéis de sacarose, respectivamente (SANCHEZ et al., 2011)

Recentes estudos demonstram que o tratamento do sêmen com ciclodextrina carregadas com colesterol pode aumentar a taxa de criopreservação de espermatozoides suínos (ZENG; TERADA, 2001), bovinos (PURDY; GRAHAM, 2004), equinos (MOORE et al., 2005) e ovinos (MOCÉ et al., 2010a). Motamedi-Mojdeh et al. (2013) observaram que a ciclodextrina e o glicerol possuem efeitos aditivos na criopreservação, sendo as melhores concentrações de ciclodextrina para as concentrações de 3, 5 e 7% de glicerol são 1,5; 3,0 e 1,5 mg, respectivamente. Já Awad (2011) encontrou melhores resultados com 2 mg de ciclodextrina associada a concentração de 3% de glicerol.

Tendo em vista que o tratamento do sêmen com ciclodextrina acrescida de colesterol pode aumentar a taxa de preservação de espermatozoides congelados, torna-se relevante o estudo do efeito deste tratamento também no sêmen ovino através de técnicas mais precisas, visando melhor elucidar sua ação, para que futuramente se busque melhores taxas de prenhez após a IA com sêmen criopreservado nesta espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ESPERMATOZOIDE E A CRIOPRESERVAÇÃO

O espermatozoide é produzido durante um processo chamado de espermatogênese, que consiste na divisão e transformação das células tronco germinativas em células maduras (EDDY; O'BRIEN, 1994; MRUK; CHENG, 2004). Ele é dividido em dois componentes principais, cabeça e flagelo, unidos pelo colo, contendo membrana plasmática cobrindo toda a célula (EDDY; O'BRIEN, 1994; MORTIMER, 1997).

O espermatozoide pode ser considerado uma célula altamente especializada, que tem a capacidade de se mover ativamente e fertilizar o ócito. Após o processo de espermatogênese, maturação no epidídimo e depósito no trato genital feminino o espermatozoide adquire essas habilidades, que são altamente dependentes da membrana (AURICH, 2005).

As técnicas de criopreservação do sêmen buscam armazenar e viabilizar seu uso futuro, buscando assim levar a célula a uma suspensão do metabolismo espermático e manutenção de suas características por um período de tempo prolongado (CELEGHINI, 2005). O sucesso da criopreservação depende de uma manutenção do potencial fertilizante dos espermatozoides, os quais devem apresentar integridade e funcionalidade das diferentes estruturas celulares (MEDEIROS et al., 2002). Contudo, o sêmen ovino se mostra extremamente sensível a estresse durante o processo de criopreservação (SALAMON; MAXWELL, 2000; ANEL et al., 2006). As mudanças fisiológicas e funcionais que ocorrem na célula espermática incluem redução irreversível da motilidade, viabilidade e integridade do acrossoma (SALAMON; MAXWELL, 2000; MEDEIROS et al., 2002).

2.1.1 Crioinjúria e criocapacitação

O processo de congelamento do espermatozoide pode levar a uma queda na qualidade do mesmo pós-descongelamento, quando observa-se queda nos parâmetros de motilidade (SALAMON; MAXWELL, 2000), perda da integridade de membranas plasmática e

acrossomal, queda do potencial mitocondrial (CELEGHINI et al., 2008), e por consequência queda na fertilidade (OLIVEIRA et al., 2014).

Vários autores enumeram as razões para essa perda de viabilidade causada pelo protocolo de criopreservação como relacionadas às mudanças na temperatura, o estresse tóxico e osmótico pela qual a célula passa devido à exposição de diferentes componentes de diferentes molaridades do diluidor, e ainda à formação de cristais intracelulares de gelo (WATSON, 2000).

Já se sabe que a refrigeração do sêmen leva o mesmo de temperaturas de 30°C a 0°C em um curto intervalo de tempo, essa taxa de refrigeração pode induzir uma tensão letal em algumas células (WATSON, 1981). Em suínos observou-se que o processo de congelamento isotérmico (32° C) levou a menor grau de crioinjúria quando comparado ao processo hipotérmico (21° C) (SCHULZE et al., 2013).

Quando a célula espermática entra em contato com uma solução hiperosmótica, antes da congelamento, a mesma passa por alterações de perda de água intracelular, encolhimento da célula e um possível influxo de íons (MAZUR, 1984), assim como a descongelamento leva ao procedimento contrário, e consequentemente, esse fluxo pode levar a lesões na membrana. As diferenças de osmolaridade pelas quais o espermatozoide tem que passar durante o processo de congelamento-descongelamento levam a perda irreversível da motilidade e lesões das membranas, sendo que o sêmen de ovinos é altamente sensível a essas alterações (CURRY; WATSON, 1994).

A teoria de formação de cristais de gelo intracelular é, no entanto, controversa e contradita em diversos estudos, os quais não os observaram em espermatozoides bovinos (RAPATZ et al, 1966), suínos (EKWALL et al., 2007;HERNANDEZ et al., 2007), equinos (MORRIS et al., 2007) e humanos (MORRIS, 2006) evidências da formação de tais cristais, contudo alguns estudos apontam a formação de cristais de gelo na cauda e peça intermediária de espermatozoides suínos (COURTENS; PAQUIGNON, 1985) e de ratos (SHERMAN; LIU, 1988).

Com isso, observa-se que o processo de congelamento, apesar de importante para a utilização do sêmen em protocolos de inseminação artificial, possui pontos negativos para a célula. É notório que esse processo leva a diminuição de parâmetros espermáticos como a motilidade, atividade respiratória, estado das membranas e qualidade do DNA (GILLAN et al., 2004).

Como consequência da crioinjúria também pode ser observada uma indução prematura de um estado semelhante à capacitação, a criocapacitação (ASHWORTH et al., 1994; MAXWELL; WATSON, 1996; BAILEY et al., 2003). Semelhanças entre a capacitação

funcional e crioinjúria não são totalmente compreendidas, mas há várias linhas de evidência que indicam alguns aspectos comuns, como padrões de fosforilação da tirosina similares, bem como padrões de coloração por clortetraciclina foram observados em ambos os espermatozoides capacitados e criopreservados (VADNAIS et al., 2005).

2.1.2 Função do colesterol na criopreservação

As membranas espermáticas são formadas por uma bicamada composta de lipídeos e proteínas, entre esses lipídeos, os predominantes são os fosfolipídeos e o colesterol (Figura 1).

Figura 1- Modelo da membrana lipídica celular e seus componentes; representação do colesterol (20%) na membrana (relação fosfolipídeo:colesterol aproximadamente 4:1)

Fonte: (SHERIFF; ALI, 2010)

O colesterol tem grande importância na célula espermática, desde a proteção de integridade das membranas até o processo de capacitação espermática (CROSS, 1998). Wechsler et al. (2003) observaram que em camundongos knockout para o gene 24-dehydrocolesterol redutase (responsável pela conversão de desmosterol em colesterol) os animais apresentaram apenas traços de colesterol nas células espermáticas, e estas eram

incompatíveis com a reprodução.

A produção do colesterol começa cedo na formação da célula espermática, onde primariamente, ocorre a expressão de genes colesterogênicos nas células germinativas dos machos (TERUYA et al., 1991; STROMSTEDT et al., 1998). Estudos sugerem que sua síntese se inicia em espermátócitos na fase de paquíteno e espermátides redondas (POTTER et al., 1981)

As mudanças que ocorrem durante o processo de capacitação são extremamente dependentes do rearranjo do colesterol na membrana plasmática (CROSS, 1998). Uma das hipóteses aceitáveis é que o colesterol excretado pelas células do epidídimo contribui para a maturação dos espermatozoides em trânsito (SAEZ et al., 2011). Durante o transporte pelo epidídimo, o conteúdo de colesterol na membrana plasmática diminui aproximadamente 50%, em ratos (REJRAJI et al., 2006; AVELDANO et al., 1992), hamsters (AWANO et al., 1993) e carneiros (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985); porém, em algumas espécies o teor de colesterol aumenta durante a maturação dos espermatozoides, como nos caprinos (RANA et al., 1991), ou permanece inalterado, como nos suínos (NIKOLOPOULOU et al., 1985).

O colesterol é um fator potente decapacitante que serve para estabilizar a membrana plasmática do espermatozoide durante o trânsito do epidídimo e evitar as interações intermoleculares responsáveis para alcançar um estado capacitado (DAVIS, 1980). A perda de colesterol aumenta a fluidez da membrana plasmática, como é visto em espermatozoides humanos (HAIDL; OPPER, 1997), o que é necessário para os passos finais da maturação do espermatozoide no trato reprodutivo feminino. Contudo, essa remoção do colesterol está restrita a fração da membrana (BOERKE et al., 2008).

Espermatozoides de espécies como humanos, coelhos e macacos tem menor sensibilidade ao choque térmico durante o processo de congelção, acredita-se que essa maior resistência suceda de uma maior quantidade na proporção colesterol/fosfolipídios e uma maior quantidade de ácidos graxos saturados em suas membranas, quando comparados com espécies mais suscetíveis como bovinos, ovinos e suínos (LADBROOK; CHAPMAN, 1969; WATSON, 1981; HOLT; NORTH, 1991).

2.2 CAPACITAÇÃO E HIPERMOTILIDADE ESPERMÁTICA

Capacitação é um processo de várias etapas em que a ativação da adenilato ciclase

dependente de bicarbonato resulta na elevação de cAMP e de proteína-kinase A mediada pela fosforilação da tirosina de um subconjunto de proteínas flagelares, levando a alterações na motilidade e responsividade acrossomal (VISCONTI et al., 1995a, 1995b; WENNEMUTH et al., 2003)

Durante a sua passagem desde os testículos até as tubas uterinas, os espermatozoides dos mamíferos encontram e interagem com diversos fluidos de origens e composições muito diferentes (por exemplo, fluido testicular, plasma seminal e secreções do útero e da tuba uterina). Estes fluidos têm grande influência sobre os processos de desenvolvimento pós-testiculares, tais como maturação e capacitação, e como resultado os espermatozoides são transformados de imóveis e inférteis a células ativas e com capacidade fecundante (JONES, et.al., 2007).

Apesar de espermatozoides criopreservados serem capazes de fertilizar os oócitos, sua expectativa de vida no trato reprodutivo feminino é consideravelmente menor quando comparada ao semên *in natura* não-capacitado (HOLT; MEDRANO, 1997; BAILEY et al., 2000).

Hiperativação é uma das características da capacitação espermática. Trata-se de uma mudança na forma da onda do batimento flagelar de uma baixa amplitude, com padrão simétrico, típica de células progressivamente móveis para uma amplitude elevada e batimento assimétrico (YANAGIMACHI, 1994). Espermatozoides hiperativados exibem uma velocidade rápida típica com movimentos em forma de uma figura de oito, que se acredita gerar as forças propulsoras necessárias para liberar os espermatozoides do epitélio do oviduto, e penetrar na matriz densa representada pela zona pelúcida (SUAREZ, 2008)

2.2.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS) na capacitação e criopreservação

As espécies reativas de oxigênio são produzidas principalmente pelas mitocôndrias encontradas na peça intermediária do espermatozoide (KOPPERS et al., 2008). Os efeitos das EROS têm sido largamente estudados por sua íntima relação com os processos de capacitação espermática (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993a), sendo apontados dois grandes adjuvantes desse processo, o peróxido de hidrogênio (AITKEN et al., 1995; RIVLIN et al., 2004) e o ânion superóxido (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993b).

O ânion superóxido participa da ativação direta da adenilato ciclase, aumentando os

níveis intracelulares de monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) que, por sua vez, estimula a atividade de tirosina kinase (ZHANG; ZHENG, 1996; BAKER et al, 2006; ICKOWICZ et al, 2012). Também é sugerido que o peróxido de hidrogênio aumenta a atividade de adenilato-ciclase através da indução de uma maior atividade de tirosina-kinase (TAN et al., 1995), criando uma cascata de auto-perpetuação envolvendo a produção de ROS, a ativação da adenilato-ciclase e a fosforilação da tirosina.

É importante ressaltar que níveis de EROS controlados são necessários para a função espermática apropriada (especialmente para a motilidade, a capacitação, a reação acrossomal, hiperativação e capacidade de fertilização), entretanto, altos níveis de EROS também podem ter um efeito patológico no gameta masculino, em caso de excesso, ou se houver um desequilíbrio com as defesas antioxidantes disponíveis, resultando em uma diminuição da viabilidade, motilidade, potencial mitocondrial, e aumento de danos no DNA, de defeitos morfológicos e peroxidação lipídica, possivelmente resultando em fenômenos semelhantes à apoptose (KOTHARI et al., 2010; MAHFOUZ et al., 2010, AITKEN et al., 2012)

2.3 CICLODEXTRINA E COLESTEROL

As ciclodextrinas (CLC) são da família de oligômeros cíclicos de glicose que têm uma superfície polar e uma cavidade hidrófoba com um diâmetro de 5-8 Å, que pode acomodar pequenas moléculas. CDs são nomeadas de acordo com o número de unidades de glicose presente na sua estrutura: α , β ou γ -CD se contiverem seis, sete ou oito anéis de sacarose, respectivamente (SANCHEZ et.al., 2011). A ciclodextrina é capaz de formar complexos de inclusão com diversas moléculas que aparentemente precisam satisfazer apenas uma condição, a de se encaixar inteira ou parcialmente na cavidade da ciclodextrina (CHALLA et al., 2005).

Quando essas ciclodextrinas são pré carregadas com colesterol, elas podem inserir o mesmo nas membranas das células (NAVRATIL et al., 2003). Devido à sua porção hidrofílica, as ciclodextrinas podem solubilizar moléculas hidrofóbicas. Além disso, a adição de resíduos metil ou hidroxipropil nas ciclodextrinas aumenta tanto sua solubilidade em água e a sua capacidade para dissolver compostos hidrofóbicos; portanto, a metil- β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina tem uma ligação de forma mais eficiente do que β -ciclodextrina (YANCEY et al., 1996).

Os espermatozoides geralmente são tratados utilizando protocolos com concentrações

de CLC variando entre 1 a 2 mg CLC/120×10⁶ espermatozoides, com uma exposição ao tratamento durante 15 minutos a temperatura ambiente, o que é suficiente para a transferência de colesterol para os espermatozoides (MOCÉ et al., 2010b).

O tratamento dos espermatozoides com CLC aumenta o teor de colesterol em 2-3 vezes em touros, trutas, carneiros e garanhões (PURDY; GRAHAM, 2004; MOORE et al., 2005; MÜLLER et al., 2008; MOCÉ et al., 2010a), este colesterol adicional eleva a relação colesterol:fosfolipídios dos espermatozoides para uma relação (> 0,8) semelhante ao de espermatozoides que não são sensíveis ao choque térmico.

O influxo de colesterol por meio da ciclodextrina aumenta também eficientemente o grau de preservação das membranas plasmática e acrossomal em carneiros (MOCÉ et al., 2010a) e em suínos (TOMÁS et al., 2014).

2.4 AVALIAÇÕES DO SÊMEN OVINO

2.4.1 Membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial

Nas espécies domésticas, as avaliações espermáticas pelo uso de sondas fluorescentes tem tido cada vez mais destaque (ANDRADE et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007, 2010).

A sonda HOECHST 33342 é uma sonda fluorescente de membrana, a qual tem a habilidade de atravessar membranas intactas, que se liga fortemente e de maneira específica a quatro pares de bases AATT na curvatura menor da dupla hélice do DNA (GARNER, 2009), emitindo uma fluorescência azul de 351 e 364 nm de comprimento de onda, sendo a fluorescência proporcional a quantidade de cromatina

O iodeto de propídio (PI) é uma sonda fluorescente para constatação da integridade da membrana plasmática, é de fácil utilização, rápida e pode ser analisada por microscopia de epifluorescência ou ser excitada com o laser de 488 nm, que a maioria dos citômetros de fluxo incluem. Essa sonda entra nas células com membrana plasmática rompida, emitindo fluorescência vermelha ao ligar-se aos ácidos nucleicos (PI: 636 nm; EH: 617 nm) (GILLAN et al., 2005).

O estado da membrana acrossomal tem sido avaliado usando sondas que reconhecem alvos dentro do acrossoma, portanto, rotulando os espermatozoides com acrossoma danificados

ou reagidos. As lecitinas, que se ligam a resíduos glucosídicos em diferentes partes da membrana acrossomal, têm sido usadas com essa finalidade, em uma grande variedade de espécies. As aglutininas do *Pisum sativum* (ervilha) (PSA) (TAO et al., 1993; CELEGHINI et al., 2010) e do *Arachis hypogaea* (amendoim) (PNA) (TAO et al., 1993; NAGY et al., 2003) têm sido as lectinas mais utilizadas para esse fim, por causa de sua especificidade. Espermatozoides marcados com lecitina podem ser fixados, permitindo uma análise posterior se necessária.

O status mitocondrial é outra característica importante da fisiologia do espermatozoide (PEÑA et al., 2009). A sonda JC-1 (iodeto de 5,5', 6,6'-tetra-cloro-1,1', 3,3'-tetrametilbenzimidazolilcarbocianina) tem sido amplamente utilizada para análise de espermatozoides. Esta sonda acumula nas mitocôndrias com baixo potencial mitocondrial como um monômero verde-fluorescente. Na presença de elevado potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), os monômeros formam agregados ("J" agregados), mudando a fluorescência para laranja (PEÑA et al., 2009). Vários estudos têm utilizado JC-1 com espermatozoides de diferentes espécies animais (touro: GARNER et al., 1997; carneiro: MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2004; CELEGHINI et al., 2010; garanhão: ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009a). Como limitação, a dupla fluorescência do JC-1 pode impedir este fluorocromo de ser combinado com outras sondas na faixa de verde-vermelho.

2.4.2 Espécies reativas de oxigênio (ROS)

Espécies reativas do oxigênio (ROS) têm um papel fundamental na fisiologia espermática, mas seu desequilíbrio pode prejudicar a capacidade de fertilização dos espermatozoides. Portanto, a sua detecção e a avaliação do estresse oxidativo são importantes tanto para estudos fisiológico como para patológicos (AGARWAL; PRABAKARAN, 2005).

A sonda CellROX Deep Red Reagent® (CAT 10422, Molecular Probes) é uma sonda relativamente nova em biologia, e foi recentemente validada para espermatozoides ovinos (ALVES, 2014). Esta pode ser uma grande alternativa na análise do estresse oxidativo, por poder ser analisada por espectrofotometria, microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. Além de poder ser executada com amostras conservadas em formaldeído (GRINBERG et al., 2013) para posterior análise. Pode ser associada também com outras sondas (AHN et al., 2012), possibilitando a realização de diversas análises concomitantemente. Esta sonda é capaz de

mensurar a quantidade de EROS celular sinalizando no citoplasma, sendo que ela é capaz de detectar o radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) com mais intensidade do que o superóxido (GRINBERG, 2013). Frente a um estresse oxidativo celular, esta sonda é oxidada (GRINBERG et al., 2012) e possui excitação/emissão máxima de 640/655 nm. Caso não tenha EROS na amostra, ela fica em seu estado reduzido e não emite fluorescência.

O estresse oxidativo nas membranas resulta em um processo denominado de peroxidação lipídica, afetando negativamente a qualidade do espermatozoide. A sonda BODIPY®581/591-C11 tem sido utilizada por citometria de fluxo para avaliar a peroxidação lipídica de espermatozoides bovinos (BROUWERS; GADELLA, 2003; ZAFFALON, 2009), cervídeos (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2009) e equinos (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009b; ANDRADE et al., 2012). Esta sonda emite fluorescência laranja no seu estado não-oxidado (excitação a 581 nm e emissão a 591 nm), mudando para a fluorescência verde quando peroxidado (excitação a 500 nm e emissão a 510 nm).

2.4.3 Capacitação espermática

A capacitação envolve uma cascata complexa de acontecimentos moleculares que inclui o efluxo do colesterol com consequente modificação da composição da membrana plasmática e fluidez (CROSS, 1998; CROSS et al., 2003), rearranjo dos fosfolípidos (FLESH, et al., 2001), alterações nas concentrações de íons intracelulares (FRASER, 1995), e aumento na fosforilação de tirosina em várias proteínas (VISCONTI et al., 1995). As consequências funcionais de todos estes processos são refletidas na capacidade dos espermatozoides se submeterem a reação acrossômica (AR), e a aquisição de um padrão distinto de motilidade conhecido como hiperativação (YANAGIMACHI, 1994).

A Merocianina 540 (M540) é uma sonda fluorescente que tem sido utilizada como uma alternativa para a detecção de capacitação (HARRISON et al., 1996). Esta sonda lipofílica se liga à membrana plasmática, e a sua fluorescência laranja (578 nm) aumenta com a diminuição da condensação dos fosfolípidos de membrana (aumento da fluidez), um dos eventos que ocorrem durante a capacitação.

2.4.4 Análise espermática computadorizada (Sperm Class Analyser-SCA)

O sistema de análise computadorizada do espermatozoide (CASA - Computer-assisted semen analysis) é uma ferramenta de análise quantitativa e qualitativa do movimento da célula espermática, que gera grandes indicadores de viabilidade e fertilidade do espermatozóide. É um sistema que está em desenvolvimento há mais de 40 anos e tem transformado as análises laboratoriais do sêmen. É uma poderosa ferramenta para a análise objetivada da motilidade espermática, onde o sistema projeta imagens sucessivas de uma suspensão de espermatozóides em uma matriz de detector; detecta objetos com base na intensidade dos pixels em um quadro ou dispersão da luz; e (3) utiliza um software especial para extrair a informação desejada e produzir a saída desejada (VINCENT, et al., 2012).

Para a análise, os espermatozóides são normalmente diluídos em uma solução padrão de sêmen puro acrescido de um diluidor complexo ou uma solução de sais simples. Nenhum desses meios é similar ao do conjunto de fluidos que os espermatozoides são sequencialmente expostos dentro do trato genital da fêmea, em termos de viscosidade ou da concentração de íons ou moléculas bioativas (AMANN; HAMMERSTEDT, 1980; OLSON et al., 2011).

O movimento de cada espermatozoide é registrado como alterações em sua localização em quadros sucessivos, e através de cálculos do programa são fornecidos resultados das medidas que descrevem o movimento (por exemplo, velocidade curvilínea [VCL], a velocidade média de percurso [VAP], a velocidade linear [VSL], amplitude de deslocamento lateral da cabeça [ALH], linearidade do percurso curvilíneo [LIN], retilinearidade do caminho médio [STR], e a frequência de batimento [BCF]) (BOYERS et al., 1989, ARRUDA et al., 2011).

Os parâmetros de movimentação fornecidos pelo sistema CASA, quando inseridos em um estudo bem delineado, podem fornecer uma fonte confiável da relação qualidade do sêmen x fertilidade (CHRISTENSEN et al., 2011; HENNING et al., 2014). Contudo, apesar dos impressionantes dados fornecidos pelo sistema CASA, o mesmo tem suas limitações, e com isso é necessário correlacionar os padrões de movimentação com os outros dados de integridade do espermatozoide (VINCENT, et al., 2012).

2.4.5 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo tem se tornado cada vez mais uma técnica amplamente utilizada para a análise do sêmen, devido a sua agilidade e diminuição dos erros em relação a outras técnicas. Além disso, apresenta a possibilidade de múltiplas análises de uma vez, sendo uma técnica de grande valia para a análise da qualidade do sêmen, podendo integrar diferentes testes simultaneamente para o entendimento da funcionalidade dos espermatozoides (PETRUNKINA et al., 2007). Sua sensibilidade mostra-se maior também, não somente pela melhora de *hardware*, mas também pelas novas técnicas de fluorescência e marcadores.

A citometria de fluxo requer que espermatozoides estejam em uma suspensão de uma única célula com baixa aglutinação ("suspensão monodispersa"). Os espermatozoides são marcados com um fluorocromo de escolha e utilizada quer na forma viável ou fixada. A escolha do fluorocromo é influenciada tanto pela aplicação quanto pelos comprimentos de onda de excitação disponível no citômetro de fluxo. Uma vez marcados, os espermatozoides são aspirados e fluem rapidamente através do fluxo, onde são iluminadas por uma fonte de luz. Na maioria dos citômetros de fluxo modernos, a fonte de luz de escolha é um laser, que emite luz em um comprimento de onda especificado (GILLAN et al., 2005; VINCENT, et al., 2012).

A análise é objetiva, tem um elevado grau de repetibilidade experimental e tem a vantagem de ser capaz de trabalhar com amostras de pequena dimensão. A citometria de fluxo também tem a capacidade de detectar marcação por vários fluorocromos associados com espermatozoides individualmente, o que significa que mais do que um atributo do espermatozóide podem ser avaliados simultaneamente. Esse recurso tem um benefício adicional para a análise do sêmen, uma vez que alguns poucos parâmetros dos espermatozoides apresentam correlação significativa com a fertilidade in vivo, dentro do intervalo aceitável de normalidade (LARSSON; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2000) e quanto mais parâmetros espermáticos forem testados, mais precisa será a previsão de fertilidade (AMMAN; HAMMERSTEDT, 1993; VINCENT, et al., 2012).

3 HIPÓTESES

Com base no exposto foram formuladas as seguintes hipóteses:

- 1 A adição de colesterol incorporado por ciclodextrina no diluidor melhora a criopreservação do sêmen ovino;
- 2 A adição de colesterol incorporado por ciclodextrina melhora a habilidade de preservação de espermatozoide de carneiros considerados como de baixa congelabilidade; mas não tem efeito sobre ejaculados de carneiros considerados como de intermediária ou alta congelabilidade.

4 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- 1 Verificar o potencial da ciclodextrina pré-carregada com colesterol como aditivo ao diluidor na proteção da cinética espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial, capacitação espermática e produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) em espermatozoides criopreservados ovinos;
- 2 Observar se existem diferenças na ação do colesterol incorporado a ciclodextrina quando comparados entre os grupos de baixa, intermediária e alta congelabilidade.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.1 EXPERIMENTO 1

Na figura 2 segue o fluxograma do delineamento experimental do primeiro experimento.

Figura 2 - Fluxograma do primeiro experimento.

5.2 EXPERIMENTO 2

Na figura 3 segue o fluxograma do delineamento experimental do segundo experimento.

Figura 3 - Fluxograma do segundo experimento

6 CAPÍTULO 1 - O USO DO COLESTEROL INCORPORADO A CICLODEXTRINA PRESERVA AS CARACTERÍSTICAS DE MOTILIDADE, INTEGRIDADE DE MEMBRANAS E POTENCIAL MITOCONDRIAL

6.1 INTRODUÇÃO

A congelação do sêmen é uma das técnicas de grande valia para o avanço das biotecnologias da reprodução, visto que seu uso viabiliza a inseminação artificial, homogeneidade de lotes, propagação de melhor genética e redução do número de machos no rebanho.

Contudo, a mesma enfrenta entraves devido a queda na viabilidade da célula espermática, sendo que as drásticas mudanças de osmolaridade e conformação da célula (CURRY; WATSON, 1994) podem levar a perda de viabilidade de grande parte das células, observado pela perda de integridade das membranas plasmática e acrossomal e queda no potencial mitocondrial (CELEGHINI et al., 2008) e queda nos parâmetros de motilidade espermática, que pode levar a uma queda na taxa de fertilidade (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Durante o processo de criopreservação podem ocorrer mudanças semelhantes a capacitação denominadas criocapacitação, o que foi observado em bovinos, suínos e equinos, que podem levar à falha na função fertilizante do espermatozoide, e, por consequência, diminuir as taxas de prenhez (BAILEY et al., 2000).

A peroxidação lipídica pode levar à uma perda na função espermática, devido a vários fatores como a inibição da geração de ATP perda da integridade e fluidez da membrana (AITKEN, 1995). Espermatozoides são altamente vulneráveis ao ataque de ROS, devido à baixa capacidade antioxidante citoplasmática e alto teor de ácidos graxos poliinsaturados da membrana (AITKEN & CURRY, 2011; DICKINSON & CHANG, 2011).

A adição de colesterol através da ciclodextrina pode ser usada para aumentar a proporção colesterol:fosfolipídeos, que causa rearranjo na membrana, levando os espermatozoides a um estado similar a aqueles que não sofrem tanto com o choque térmico causado pela congelação (MOCÉ et al., 2010b). Estudos nas espécies suína (ZENG; TERADA, 2001), bovina (PURDY; GRAHAM, 2004), equina (MOORE et al., 2005) e ovina (MOCÉ et

al., 2010a) mostraram que o tratamento com colesterol incorporado a ciclodextrina aumenta em grande porcentagem o número de células viáveis pós-descongelamento.

Com base no exposto esse estudo teve por finalidade constatar se a adição de colesterol incorporado a ciclodextrina melhora a preservação dos parâmetros de motilidade, integridade de membranas, potencial mitocondrial, morfologia espermática, capacitação espermática, produção de radicais livres e peroxidação lipídica de espermatozoides congelados ovinos.

6.2 MATERIAL E MÉTODO

6.2.1 Animais

Foram utilizados seis ovinos machos, hígidos da raça White Dorper com idade entre 2 e 4 anos. Durante o período experimental, os carneiros foram mantidos em um mesmo piquete nas dependências do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga.

Os carneiros foram avaliados previamente ao início do experimento por exame clínico geral e andrológico, sendo utilizados somente animais hígidos. Foram considerados como hígidos os carneiros que apresentaram temperatura, frequências cardíaca e respiratória e movimentos ruminais dentro do normal para espécie; OPG com menos de 300 ovos por grama de fezes e sem afecções aparentes. Ainda foram considerados animais com peso superior a 50 kg, escore de condição corporal (ECC) superior a 2,5 (1-5) e parâmetros reprodutivos condizentes com os preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013).

6.2.2 Divisão dos Grupos Experimentais

Para a execução desse experimento foram utilizados cinco ejaculados de cada um dos seis carneiros (n=30). Foram selecionados ejaculados que apresentaram pré-criopreservação: motilidade $\geq 70\%$; vigor ≥ 3 ; alterações morfológicas espermáticas totais $\leq 30\%$, parâmetros

esses referentes aos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013).

Cada ejaculado foi previamente analisado (técnicas descritas a seguir) e em seguida dividido em três alíquotas, nas quais foram administrados os tratamentos: controle, somente diluidor (CON); diluidor acrescido de ciclodextrina agregada ao colesterol (CLC+CHO); e diluidor acrescido de ciclodextrina pura (CLCP).

6.2.3 Colheita e Análises do Sêmen Pré-criopreservação

O sêmen foi colhido por vagina artificial com o auxílio de um tubo cônico graduado (14 mL) pré-aquecido (37° C), envolto em suporte de isopor para manter a temperatura. Logo após a colheita, o sêmen foi levado ao laboratório, mantido em banho-maria à temperatura de 37°C, avaliado quanto ao volume, cor e aspecto. Foram avaliadas também a motilidade, concentração, morfologia espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio.

6.2.4 Análise Subjetiva e Computadorizada do Sêmen

O volume, a cor e o aspecto foram avaliados visualmente no tubo de colheita. A motilidade espermática foi avaliada por meio do *software* Sperm Class Analyser (SCA – Microoptics Barcelona, Espanha), acoplado a um microscópio equipado com contraste de fase (Nikon, Modelo Eclipse Ni-U 80i) com sêmen diluído em meio TALP *sperm* (Anexo A) ($12,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL), com ajuste prévio do setup para sêmen ovino (Anexo D). As análises foram feitas no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES-FMVZ/USP). Foram analisadas as características: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %) (Figura 4).

A concentração espermática foi realizada por meio da diluição do sêmen em formol salino 5% (Anexo B) na proporção 1:400, sendo colocado 5 μL de sêmen em 1995 μL de formol salino tamponado e a contagem de espermatozoides foi feita em câmara de Neubauer, aumento

de 400x.

Para a morfologia espermática o sêmen foi diluído em formol salino tamponado 5%, sendo colocada gota do sêmen diluído entre lâmina e lamínula e observados em microscopia de contraste de interferência diferencial (Nikon, modelo 80i) com aumento de 1.000 x, contando-se 200 células por amostra.

Figura 4 - Imagem gerada da tela do programa de análise computadorizada do sêmen (CASA) Sperm Class Analyzer (SCA)

Legenda: O trajeto vermelho representa os espermatozoides com motilidade progressiva rápida, em verde os espermatozoides com motilidade progressiva lenta, em azul os espermatozoides sem motilidade progressiva e em amarelo os espermatozoides imóveis.

Fonte: (BATISSACO, 2014)

6.2.5 Análises da membrana plasmática, acrossoma e potencial mitocondrial

As membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial foram avaliadas pela

associação de sondas fluorescentes (Anexo C), descrita por Celeghini et al. (2010). Resumidamente, as amostras de sêmen foram diluídas TALP Sperm (Anexo A) em microtubos a fim de se obter a concentração final de 25×10^6 sptz/mL, em seguida era retirada uma alíquota de 150 μ L onde eram adicionados: 2 μ L de Hoescht 33342 (0,5 mg/mL, Molecular Probes), 3 μ L de iodeto de propídio (0,5 mg/mL, Sigma-Andrich), 50 μ L de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionado de fluoresceína (FITC-PSA, 100 μ g/mL, Sigma-Andrich) e 2 μ L de iodeto de 5,5',6,6'tetracloro 1,1',3,3'tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1, 153 μ M, Sigma-Andrich). Essa amostra era incubada a 37° C por 8 minutos, com conseguinte leitura feita sob microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon Tóquio, Japão) em aumento de 1.000 x (Figura 5), utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm).

Figura 5 – Espermatozoides ovinos corados pela técnica da tripla coloração descrita por Celeghini et al. (2010) de avaliação das membranas plasmáticas, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

Legenda: A: PIAIA (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta, alto potencial de membrana mitocondrial); em B: PIAIB (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta, baixo potencial de membrana mitocondrial); em C: PIALA (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada, alto potencial de membrana mitocondrial) em D: PIALB (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada, baixo potencial de membrana mitocondrial); em E: PLAIA (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta, alto potencial de membrana mitocondrial); em F: PLAIB (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta, baixo potencial de membrana mitocondrial); em G: PLALA (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada, alto potencial de membrana mitocondrial); e em H: PLALB (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada, baixo potencial de membrana mitocondrial)

Fonte (CELEGHINI et al., 2010)

6.2.6 Análise da produção de EROS

A avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio foi avaliada pela sonda fluorescente Cell ROX Deep Red Reagent[®] 2,5 mM (Invitrogen) (Figura 6), como descrita por Alves (2014). A sonda CellRox foi diluída em dimetil sulfóxido (DMSO, código 472301, Sigma-Aldrich) para a concentração final de 1 mM (solução trabalho), sendo armazenada a -20° C, protegida da luz. No momento da utilização, a solução trabalho contendo Cell ROX Deep

Red Reagent[®] era mantida no escuro a 37° C. Para o preparo da técnica foram utilizados 200 μ L (25x10⁶ espermatozoides/mL) de cada amostra do sêmen e adicionados 0,5 μ L de CellROX[®] (1 mM, Invitrogen) e 2 μ L de Hoescht 33342 (2,5 mg/mL, Molecular Probes), sendo a amostra incubada a 37° C por 30 minutos para posterior leitura. Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 2.000g, o sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuspensionado em 200 μ L de TALP (Anexo A), como validado para ovinos por Alves (2014).

Figura 6 – Espermatozoides ovinos corados pela sonda CellROX[®] e Hoescht 33342

Legenda: A: espermatozoide sem ou com leve estresse oxidativo. Em B: espermatozoide com estresse oxidativo moderado. Em C: espermatozoide com estresse oxidativo intenso
Fonte: (ALVES, 2014)

6.2.7 Preparação da Ciclodextrina

A ciclodextrina de escolha foi a metil- β -ciclodextrina (C4555-10g, Sigma-Aldrich), preparada na concentração de 2 mg de ciclodextrina/120 x 10⁶ espermatozoides, como descrito para ovinos por Mocé et al. (2010a) e Purdy et al. (2010).

A CLC foi pré-carregada com colesterol para a preparação do complexo de CLC+CHO como descrito por Purdy e Graham (2004). A preparação do complexo CLC+CHO foi feita em um tubo de vidro, onde 200 mg de colesterol (cod. C3045-5g, Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio. Em um segundo tubo de ensaio, 1 g de Metil- β -ciclodextrina (C4555-

10g, Sigma-Aldrich) foi dissolvida em 2 mL de metanol. Após essa etapa, uma alíquota de 0,45 mL da solução de colesterol foi adicionada à solução de ciclodextrina, e a mistura foi agitada com bastão de vidro até que a solução combinada tornou-se clara. A solução combinada de CLC+CHO foi então despejada em uma placa de Petri e os solventes foram retirados por meio de um fluxo de gás de nitrogênio. Os cristais resultantes foram deixados para secar por um período adicional de 24 h (22°C) e posteriormente retirados da placa de Petri e armazenados em um recipiente de vidro âmbar em congelador (-20°C) até sua utilização. Para facilitar a manipulação a CLC foi alíquotada em microtubos de 1,5 mL em alíquotas de 25; 12,5 e 10 mg de CLC determinadas em balança analítica de precisão.

Para incorporação do colesterol aos espermatozoides, foi preparada uma solução de trabalho por meio da adição de 10 mg de CLC+CHO a 200µL de meio diluidor Tris trabalho (TrisT) (200 mM Tris, 71 mM ácido cítrico, 55 mM Frutose, pH=7,4; 300 mOsm) sem diluidor, a 37°C e homogeneizada com agitador tipo vórtex, imediatamente antes de se acrescentar ao sêmen. Após a homogeneização foi adicionado à alíquota de sêmen apenas o volume calculado da solução de trabalho (dose 2 mg de CLC/ 120x10⁶sptz), e incubado por 15 min a 32°C.

A divisão da CLC (em pó) em alíquotas reduz o desperdício, uma vez que se pode diluir apenas a quantidade exata necessária para o volume e a concentração espermática da alíquota do ejaculado. Na diluição da CLC deve-se manter sempre a concentração de 50mg de CLC/mL na solução de trabalho (exemplo: 25 mg de CLC devem ser diluídos em 500 µL de solução Tris-300mOsm).

6.2.8 Criopreservação do Sêmen

Após as análises o sêmen foi dividido em três alíquotas, onde foram acrescentados os três tratamentos através do método de três etapas (3 *step*). Na 1ª etapa foram acrescentados ao sêmen (nos tubos identificados): solução de trabalho Tris (CON); Ciclodextrina + colesterol ressuspensos em solução de trabalho Tris (CLC+CHO); e Ciclodextrina pura ressuspensa em solução de trabalho Tris (CLCP).

Em seguida para a 2ª etapa foi acrescentado o diluidor comercial Botubov® na proporção de 1:1, no qual se esperou um período de 10 minutos para a interação entre sêmen e diluidor. E na 3ª etapa foi colocado o restante do diluidor. A amostra foi então homogeneizada e envasada em palhetas francesas de 0,5 mL, identificados com nome/número do animal, partida e

tratamento.

Para a criopreservação do sêmen foi utilizado o aparelho portátil da marca Tetakon, TK 3000[®] (TK Tecnologia em Congelação Ltda., Uberaba, Minas Gerais, Brasil), composto por um aparelho programável, equipado com um porta-palhetas, um tubo de refrigeração e uma caixa térmica para nitrogênio líquido. Para a refrigeração, as palhetas foram colocadas no porta-palhetas, acondicionado no tubo de refrigeração, seguindo uma curva de $-0,25^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até alcançar a temperatura de 5°C , com duração média de uma hora e 10 minutos. Em seguida, o porta-palhetas foi movido para a caixa térmica contendo nitrogênio líquido, onde foi iniciada uma curva de congelamento de $-20^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até atingir -120°C , com duração média da curva de congelamento de 10 minutos. E por fim, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C). Após esse processo as palhetas foram acondicionadas em racks e armazenadas em botijões criogênicos para posterior análise.

6.2.9 Análise do Sêmen Pós-criopreservação

Para a análise do sêmen pós-criopreservação, duas palhetas de sêmen de cada tratamento foram descongeladas a 37°C por 30 segundos, homogeneizadas em um microtubo e mantidas em banho-Maria seco a 37°C . Foram analisadas as características de motilidade e vigor subjetivos sob microscopia de contraste de fase, motilidade computadorizada utilizando o SCA e morfologia espermática por microscopia de contraste de interferência diferencial, como descrito para o sêmen *in natura*. Além destas avaliações, foram realizadas análises das membranas espermáticas, produção de espécies reativas de oxigênio e fluidez das membranas utilizando a citometria de fluxo, bem como avaliação do potencial de membrana mitocondrial por microscopia de epifluorescência, como descrito a seguir.

6.2.9.1 Avaliações espermáticas por meio da técnica de citometria de fluxo

As análises por citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (FZEA-USP). Para tanto, as amostras para coloração e análise em citometria de fluxo foram diluídas no meio Tyrode's albumina lactato piruvato (TALP;

Anexo A) (BAVISTER et al., 1983), e quando analisada a Merocianina 540 foram diluídas em meio modificado de Tyrode's (TALPm) contendo 114 mM de NaCl, 3,2 mM de KCl, 0,5 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,4 mM de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 5 mM de glicose, 10 mM de lactato de sódio, 0,1 mM de piruvato de sódio, 10000 UI/100 mL de penicilina sódica. O pH do meio foi corrigido para 7,4 com o uso de NaOH 5 N.

Após a adição das sondas fluorescentes indicadas, as amostras de sêmen incubadas foram analisadas no citometro de fluxo BD FACS Aria (Beckton-Dickeson, San Jose, USA) controlado pelo software BDFACSDiva 6.0 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA). As amostras passaram no instrumento com uma taxa de aquisição de aproximadamente 600-1000 eventos/s, sendo adquiridas 10000 células por análise. As células foram excitadas simultaneamente por um laser de argônio na faixa de 488 nm e por um laser Near UV na faixa de 375 nm.

6.2.9.1.1 Avaliação das membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo

As alíquotas retiradas das amostras foram adicionadas ao TALP sperm (Anexo A) em tubos de microcentrifugação (1,5 mL) pré-aquecidos a 37°C, a fim de se obter amostras com concentração de 5×10^6 espermatozoides por mL. A seguir, foi adicionado 2 µL da sonda Hoechst 33342 (H33342; 40 µg/mL, H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. O uso desta sonda teve como objetivo, corar o DNA das células espermáticas para que não haja a contagem de forma equivocada de partículas com o mesmo tamanho e granulosidade do espermatozoide (DE ANDRADE et al., 2011). Passado o período de incubação, foram adicionados à amostra 3 µL de Iodeto de Propídio (IP-0,5 mg/mL, L0770, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, Missouri, EUA), conjuntamente com a adição de 10 µL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA-100 µg/mL, L-0770, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, Missouri, EUA) estas sondas com os seguintes objetivos; corar as células com membrana plasmática lesada (IP positivo) e com a membrana acrossomal lesada (FITC-PSA positivo) (CELEGHINI et al., 2010) (Figura 7). Após 10 minutos de incubação a 37°C, os espermatozoides foram diluídos com a adição de 150 µL de TALPm e transferidos para tubos graduados até 15 mL (37°C). Com isso, as amostras apresentaram uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides por mL no momento de serem analisadas pela técnica de citometria de fluxo.

Figura 7 - Gráfico gerado pelo citometro de fluxo a partir do software FACSDiva 6.1, utilizando as sondas para integridade da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides ovinos pós descongelamento

Legenda: A) Pré-seleção espermática através do tamanho e complexidade interna das células. B) Seleção da população Hoechst 33342 (H33342) positiva a partir da população pré-selecionada no gráfico A. C) Dotplot com quadrante que possibilita a divisão dos espermatozoides positivos para H33342 em quatro populações distintas: AIML – acrossoma íntegro e membrana plasmática lesionada; ARML – acrossoma reagido e membrana plasmática lesionada; AIMI – acrossoma e membrana plasmática íntegra; ARMI – acrossoma reagido e membrana plasmática íntegra. D) Tabela estatística gerada pelo software com o percentual de cada população analisada.

Fonte (BATISSACO, 2014)

6.2.9.1.2 Avaliação da produção de EROS por citometria de fluxo

Foram retiradas alíquotas de sêmen durante as etapas de análise a fim de obter amostras diluídas em TALPm com 5×10^6 espermatozoides/mL. Estas foram então coradas com 0,5 μ L da sonda C11-BODIPY581/591 (1 mg/mL, D-3861, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) por 30 minutos a 37°C (RAPHAEL, 2007). Passado o período de incubação, foram transferidas para outros microtubos 145 μ L destas soluções, agora, coradas com a sonda C11-BODIPY581/591. A estas amostras foram adicionados 2 μ L de Hoechst 33342 com posterior

incubação por 10 minutos a 37°C. Então, foram adicionadas as amostras 3 µL de Iodeto de Propídio. Após 5 minutos de incubação a 37°C, os espermatozoides foram diluídos com a adição de 150 µL de TALPm e transferidos para tubos graduados de 15 mL (37°C). Com isso, as amostras apresentaram uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides por mL no momento de serem analisadas por citometria de fluxo. Na Figura 8 estão exemplos dos gráficos gerados a partir das amostras coradas pela sonda C11-BODIPY581/591.

Figura 8 - Gráfico gerado pelo citômetro de fluxo a partir do software FACSDiva 6.1, utilizando a sonda para estresse oxidativo (BODIPY) dos espermatozoides ovinos pós descongelamento

Legenda: A) Pré-seleção espermática através do tamanho e complexidade interna das células. B) Seleção da população Hoechst 33342 (H33342) positiva a partir da população pré-selecionada no gráfico A. C) Dotplot com a separação das células positivas (mortas) e negativas (vivas) para Iodeto de Propídio. D) Histograma de FITC-A (fotomultiplicador longpass 502 e bandpass 530/15) gerado a partir das células vivas. E) Mediada da intensidade de fluorescência das células positivas para o a sonda fluorescente C11-Bodipy581/591.

Fonte (BATISSACO, 2014)

6.2.9.1.3 Avaliação da fluidez da membrana plasmática por citometria de fluxo

Para a análise da estabilidade da membrana plasmática pela técnica de citometria de fluxo (FLESCH et al., 1999), as amostras foram incubadas em solução de TALPm na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL em um volume final de 147 μ L. Foram então adicionados 2 μ L de Hoechst 33342 com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. Em seguida 0,5 μ L a sonda fluorescente Yo-Pro-1 foi adicionada à amostra (7,5 μ M-Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) obtendo-se uma concentração final de 25 nM. A membrana plasmática íntegra é impermeável ao Yo-Pro-1, o qual se liga ao DNA das células com a membrana plasmática lesada. Então, a amostra foi incubada por 20 minutos e posteriormente foi adicionada 0,5 μ L da sonda fluorescente Merocianina 540 (810 μ M-Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) a fim de se obter uma concentração de 2,7 μ M em uma solução final de 150 μ L, em seguida estas foram incubadas por 70 segundos. Foram então diluídas em 150 μ L de TALPm e analisadas por citometria de fluxo, no qual foram avaliadas as porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (Yo-Pro-1 negativo) com aumento na desordem da bicamada lipídica (Merocianina 540 positivo) (Figura 9).

Figura 9 - Gráficos gerado pelo citometro de fluxo a partir do software FACSDiva 6.1, utilizando a sonda para capacitação dos espermatozoides ovinos pós descongelação

Legenda: A) Pré-seleção espermática através do tamanho e complexidade interna das células. B) Seleção da população Hoechst 33342 (H33342) positiva a partir da população pré-selecionada no gráfico A. C) Dotplot com a separação das células positivas (mortas) e negativas (vivas) para Yo-pro1. D) Histograma de PE-A (fotomultiplicador longpass 595 e bandpass 610/20nm) gerado a partir das células vivas. E) Mediada da intensidade de fluorescência das células positivas para Merocianina-540.

Fonte (BATISSACO, 2014)

6.2.9.2 Avaliação do potencial mitocondrial e estresse oxidativo por Microscopia de Epifluorescência

Foi analisado o potencial mitocondrial como previamente descrito adicionando-se 2 μ L de Hoescht 33342 (0,5 mg/mL, Molecular Probes) e 2 μ L de iodeto de 5,5',6,6'tetracloro 1,1',3,3'tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1, 153 μ M, Sigma-Andrich). As amostras foram incubadas a 37° C por 8 minutos, com conseguinte leitura feita sob microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon Tóquio, Japão) em aumento de 1.000X (Celeghini et al., 2010). O potencial mitocondrial não foi realizado citometria de fluxo, pois ainda não havia sido feita a compensação dessa sonda no aparelho.

O estresse oxidativo dos espermatozoides foi também avaliado pela sonda CellROX Deep Red Reagent® 2,5 mM (Invitrogen) por microscopia de epifluorescência, como descrito anteriormente (Alves, 2014).

6.2.10 Análise Estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias. Quando a normalidade e/ou homogeneidade do teste foi significativa ($P < 0,05$), os dados foram transformados e reavaliados. Comparações entre os tratamentos (CON, CLC+CHO e CLCP) foram analisadas pelo procedimento misto (PROC MIXED) do SAS (Versão 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Quando o efeito de tratamento foi significativo, as diferenças entre grupos foram localizadas através do Teste de Tukey. Dados que, mesmo após transformação, continuaram sendo significativos nos testes de normalidade e/ou homogeneidade, foram analisados por estatística não-paramétrica de ordem (Teste de Kruskal-Wallis). A probabilidade de $P \leq 0,05$ foi considerada como diferença significativa e probabilidade entre $P > 0,05$ e $\leq 0,1$ foi considerada como diferença aproximando-se de ser significativa (tendência estatística). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), a não ser por indicação contrária.

6.3 RESULTADOS

Para os parâmetros de motilidade espermática avaliados pós-descongelação foi observado que o grupo CLC+CHO mostrou dados estatisticamente superiores ($p < 0,05$) nos quesitos motilidade subjetiva (análise subjetiva), motilidade total, motilidade progressiva e porcentagem de células rápidas quando comparadas aos grupos CON e CLCP (Tabela 1). Ainda, o grupo CLCP se mostrou inferior para a preservação espermática para todas estas características quando comparado tanto com o grupo CON quanto com o grupo CLC+CHO.

Para a morfologia espermática o grupo CLC+CHO mostrou maior número de defeitos maiores, e totais em comparação ao grupo CLCP e um maior número de defeitos menores quando comparado aos grupos CON e CLCP ($\text{CLC+CHO} > \text{CON} > \text{CLCP}$); contudo, apresentou percentuais semelhantes de defeitos maiores e totais comparados ao grupo CON. O grupo CLCP mostrou os menores valores de defeitos maiores, menores e totais quando comparado aos grupos CON e CLC+CHO (tabela2).

Tabela 1 - Média $\pm$ erro padrão das características de vigor (0-4) e motilidade (MS, %) avaliados subjetivamente e características avaliadas pelo programa Sperm Class Analyser (SCA).

	<i>In Natura</i>	Tratamentos			Média	<i>p</i>
		CON	CLC+CHO	CLCP		
MS (%) *	79,83 $\pm$ 1,387 ^a	49,81 $\pm$ 4,25 ^c	65,00 $\pm$ 3,44 ^b	1,62 $\pm$ 1,38 ^d	49,18 $\pm$ 3,12	< 0,0001
Vigor (1-5)	4,26 $\pm$ 0,10 ^a	2,68 $\pm$ 0,10 ^b	2,82 $\pm$ 0,11 ^b	0,20 $\pm$ 0,11 ^c	2,50 $\pm$ 0,14	< 0,0001
MT (%)	75,47 $\pm$ 2,04 ^a	49,02 $\pm$ 4,22 ^c	65,49 $\pm$ 3,40 ^b	1,59 $\pm$ 1,23 ^d	47,88 $\pm$ 2,99	< 0,0001
MPROG (%)	56,49 $\pm$ 2,03 ^a	26,19 $\pm$ 2,76 ^c	37,39 $\pm$ 2,53 ^b	0,69 $\pm$ 0,60 ^d	30,19 $\pm$ 2,13	< 0,0001
RAP (%)	66,06 $\pm$ 2,34 ^a	31,35 $\pm$ 3,67 ^c	43,95 $\pm$ 3,69 ^b	0,70 $\pm$ 0,63 ^d	35,52 $\pm$ 2,59	< 0,0001
VCL (μm/s)	146,35 $\pm$ 4,09 ^a	96,00 $\pm$ 5,22 ^b	101,22 $\pm$ 4,70 ^b	11,14 $\pm$ 4,65 ^c	88,68 $\pm$ 5,04	< 0,0001
VSL (μm/s)	118,35 $\pm$ 3,24 ^a	70,94 $\pm$ 4,22 ^b	74,89 $\pm$ 3,85 ^b	7,59 $\pm$ 3,34 ^c	67,95 $\pm$ 4,05	< 0,0001
VAP (μm/s)	135,56 $\pm$ 3,88 ^a	83,16 $\pm$ 4,78 ^b	88,18 $\pm$ 4,39 ^b	8,88 $\pm$ 3,90 ^c	78,94 $\pm$ 4,65	< 0,0001
LIN (%)	81,05 $\pm$ 0,98 ^a	73,43 $\pm$ 1,04 ^b	73,09 $\pm$ 1,37 ^b	13,19 $\pm$ 5,15 ^c	60,08 $\pm$ 2,87	< 0,0001
STR (%)	87,50 $\pm$ 0,81 ^a	85,12 $\pm$ 0,64 ^b	84,56 $\pm$ 0,83 ^b	19,72 $\pm$ 6,81 ^c	69,09 $\pm$ 3,15	0,0109
ALH (μm)	2,47 $\pm$ 0,08 ^b	2,65 $\pm$ 0,04 ^a	2,53 $\pm$ 0,06 ^{ab}	0,34 $\pm$ 0,16 ^c	0,99 $\pm$ 0,10	0,0597
BCF (Hz)	9,07 $\pm$ 0,22 ^a	8,76 $\pm$ 0,15 ^a	9,01 $\pm$ 0,15 ^a	1,10 $\pm$ 0,47 ^b	6,97 $\pm$ 0,34	< 0,0001

^{a,b,c,d} Linhas com letras sobresscritas minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

* Linhas com letras sobresscritas minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Legenda: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MPROG, %), células rápidas (RAP, %), velocidade do trajeto (VAP, μ m/s), velocidade progressiva (VSL, μ m/s), velocidade curvilínea (VCL, μ m/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH, μ m), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %) para sêmen de ovinos *in natura* e pós-descongelamento nos grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor), CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol), e CLCP (diluidor acrescido de ciclodextrina pura)

Tabela 2 - Média $\pm$ erro padrão das características de morfologia espermática do sêmen ovino quanto a porcentagem de defeito maiores, menores e totais.

	<i>In Natura</i>	Tratamentos			Média	<i>p</i>
		CON	CLC+CHO	CLCP		
DMa (%)	3,45 $\pm$ 0,82 ^c	15,54 $\pm$ 1,75 ^a	17,41 $\pm$ 3,21 ^a	8,75 $\pm$ 1,96 ^b	11,29 $\pm$ 1,30	< 0,0001
DMe (%)	2,62 $\pm$ 0,64 ^c	7,20 $\pm$ 1,02 ^b	11,25 $\pm$ 1,24 ^a	2,54 $\pm$ 0,59 ^c	5,90 $\pm$ 0,68	< 0,0001
DT (%)	6,08 $\pm$ 1,41 ^c	22,75 $\pm$ 2,33 ^a	28,66 $\pm$ 3,73 ^a	11,29 $\pm$ 2,17 ^b	17,19 $\pm$ 1,79	< 0,0001

^{a,b,c} Linhas com letras sobresscritas minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Legenda: características de defeitos maiores (DMa, %), defeitos menores (DMe, %) e defeitos totais (DT, %) observadas por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) para sêmen de ovinos *in natura* e pós-descongelamento nos grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor), CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol), e CLCP (diluidor acrescido de ciclodextrina pura).

No tocante as características de membrana acrossomal e plasmática observou-se que o grupo CLC+CHO foi superior aos grupos CON e CLCP, com maior número de células com acrossomo íntegro e membrana plasmática íntegra (PIAI), membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial mitocondrial (Figura 10). O grupo CLCP se mostrou com os menores valores quando comparado aos demais grupos. O grupo CLC+CHO apresentou percentual de células com integridade de acrossomo estatisticamente iguais aos do sêmen *in natura* (Figura 10, painel C).

Figura 10 - Média $\pm$ erro padrão das características de integridade de membranas plasmática e acrossomal e potencial mitocondrial do sêmen ovino *in natura* e pós-descongelção nos grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor), CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol), e CLCP (diluidor acrescido de ciclodextrina pura)

a,b,c,d Linhas com letras sobrescritas minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. (A e B) ou pelo teste de Tukey (C e D).

Legenda: A: PIAI, espermatozoides apresentando características de membrana plasmática íntegra e acrossomo íntegro; B: PI: espermatozoides apresentando características de membrana plasmática íntegra; C: AI: espermatozoides apresentando características de acrossomo íntegro; D: APM: espermatozoides apresentando características de alto potencial mitocondrial.

Quando comparados os grupos em relação a formação de radicais livres (hidroxila e superóxido), não foram observadas diferenças entre os grupos CON e CLC+CHO. Contudo, o grupo CLCP obteve maiores taxas de estresse oxidativo ausente ou leve (EOAL) e menores taxas de estresse oxidativo moderado (EOM) quando comparado aos grupos CON e CLC+CHO. Não foram observadas diferenças entre os três grupos em relação ao estresse oxidativo intenso (EOI) (Tabela 3). Os três tratamentos mostraram redução no número de espécies reativas em relação ao sêmen *in natura* observado pela queda no número de células EOM e no aumento de células EOAL.

Tabela 3 - Média $\pm$ erro padrão das características de estresse oxidativo, observado pelo CellRox, do sêmen ovino *in natura* e pós-descongelamento nos grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor), CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol), e CLCP (diluidor acrescido de ciclodextrina pura)

	Tratamentos				Média	p
	<i>In Natura</i>	CON	CLC+CHO	CLCP		
EOAL (%)	89.78 $\pm$ 1.77 ^c	97.95 $\pm$ 0.51 ^b	93.21 $\pm$ 2.13 ^b	99.68 $\pm$ 0.12 ^a	95.16 $\pm$ 0.78	< 0.0001
EOM (%)	9.89 $\pm$ 1.71 ^a	1.74 $\pm$ 0.41 ^b	6.63 $\pm$ 2.09 ^b	0.24 $\pm$ 0.10 ^c	4.62 $\pm$ 0.76	< 0.0001
EOI (%)	0.32 $\pm$ 0.13	0.30 $\pm$ 0.14	0.14 $\pm$ 0.09	0.06 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.05	0,1497

^{a,b,c} Linhas com letras sobrescritas minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Legenda: estresse oxidativo ausente ou leve (EOAL, %), estresse oxidativo moderado (EOM, %) e estresse oxidativo intenso (EOI, %)

Não foi observada diferença significativa no tocante à presença do processo de peroxidação lipídica quando comparado o grupo CLC+CHO com o grupo CON. O grupo CLCP mostrou menores valores de peroxidação lipídica quando comparado aos grupos COM e CLC+CHO (Figura 11).

Figura.11 - Média $\pm$ erro padrão das características de peroxidação lipídica do sêmen pós-descongelamento entre os grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor), CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol), e CLCP (diluidor acrescido de ciclodextrina pura)

^{a,b} Linhas com letras sobrescritas minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

Com respeito ao processo de capacitação espermática, não foram encontradas diferenças entre os grupos CON e CLC+CHO. Contudo, o grupo CLCP apresentou os menores valores de fluidez da membrana quando comparado aos demais grupos (Figura 12).

Figura 12 - Média $\pm$ erro padrão das características de fluidez da membrana, indicativo de capacitação pela citometria de fluxo do sêmen pós-descongelamento entre os grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor), CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol), e CLCP (diluidor acrescido de ciclodextrina pura)

^{a,b} Linhas com letras sobrescritas minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

6.4 DISCUSSÃO

Os espermatozoides são extremamente sensíveis ao processo de criopreservação, pois sofrem mudanças em suas propriedades físicas e químicas (MAZUR, 2004), o que leva a célula espermática a grandes respostas físicas. Com isso, durante o processo de criopreservação observa-se uma queda na qualidade espermática, e consequentemente uma queda na fertilidade. Os resultados descritos deixam claro que o influxo de colesterol para o interior da célula melhora a preservação do sêmen pós-descongelamento.

6.4.1 Ciclodextrina incorporada ao colesterol contribui para preservar a motilidade espermática

A cinética espermática é um grande indicador da qualidade espermática e da capacidade fecundante do espermatozoide, sendo de grande importância a manutenção da motilidade após o processo de congelamento (ARRUDA, et al., 2011).

Os resultados demonstram uma grande melhora na preservação dos parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva, porcentagem de células rápidas e deslocamento lateral de cabeça (Tabela 1) quando adicionado ao diluidor colesterol incorporado por ciclodextrina, sendo consistente com a grande maioria dos trabalhos em bovinos (MOCÉ e GRAHAM, 2006), asininos (ÁLVAREZ et al., 2006), ovinos (MOCÉ et al., 2010a; PURDY et al., 2010) e camundongos (LOOMIS e GRAHAM, 2008).

Já foi observado que o uso da Metil- β Ciclodextrina aumenta os parâmetros de motilidade total e motilidade progressiva dos espermatozoides ovinos, principalmente quando utilizada na concentração de 2 mg/120x10⁶sptz (MOCÉ et al., 2010a). O que também pode ser observado em coelhos (NISHIJIMA, et al. 2014), bovinos (PURDY e GRAHAM, 2004; MOCÉ et al., 2014) e caprinos (MOCÉ et al., 2014).

Esses estudos, juntamente com os resultados de maior preservação de motilidade total, progressiva e porcentagem de células rápidas, reforçam a superioridade do uso da Metil- β -Ciclodextrina e na concentração de 2 mg/120x10⁶sptz.

Os resultados mostram que a ciclodextrina acrescida de colesterol preserva com maior eficácia os parâmetros de motilidade dos espermatozoides ovinos congelados.

6.4.2 O uso da ciclodextrina incorporada ao colesterol não influencia a morfologia espermática

A morfologia espermática é de grande importância, pois pode afetar o potencial de fertilidade (VERSTEGEN et al., 2002; ZAHALSKY et al., 2003).

Como pode se observar não houve diferença, entre os grupos CLC+CHO e CON, exceto em defeitos menores (Tabela 2), isso se deve principalmente ao fato de que CLC+CHO apresentou maior número de espermatozoides com cauda dobrada, alterando a média desse grupo. O esperado para o sêmen que passou pelo processo de criopreservação é de um aumento nos percentuais de defeitos morfológicos espermáticos (VERSTEGEN et al., 2002; PETRUNKINA et al., 2005).

O fato de o grupo CLCP ter apresentado os menores valores de defeitos pode estar relacionado à morte das células espermáticas durante o tempo de estabilização do tratamento, antes mesmo da congelação do sêmen, sendo que assim a membrana plasmática já não estava funcional para responder ao choque térmico e não houve alteração de morfologia destas células. Observou-se com isso que a morfologia espermática é indiferente a concentração de colesterol intracelular, porém quando sua retirada é excessiva (grupo CLCP) ocorre uma diminuição nas patologias espermáticas.

6.4.3 A ciclodextrina incorporada ao colesterol confere melhor proteção às membranas e aumenta o potencial mitocondrial

A integridade de membranas está intimamente ligada à qualidade do sêmen tanto quanto a integridade estrutural do espermatozoide quanto a sua capacidade fecundante (OLIVEIRA et al., 2014). Já a matriz mitocondrial é responsável pelo aporte energético da célula espermática, por isso o conhecimento a cerca de seu potencial é de suma importância para determinar se a produção de energia dessa célula não foi comprometida. Na literatura é bem relatado que o processo de criopreservação pode levar a aumento da fluidez das membranas com aumento de volume e ruptura das membranas plasmática e acrossomal (HAMMERSTEDT et al., 1990; HOLT, 2000) e modificações na arquitetura mitocondrial (COUNTERS et al.; 1989).

O tratamento com ciclodextrina incorporada ao colesterol mostrou um grande potencial de proteção das membranas acrossomal e plasmática (Figura 10, painéis A, B e C), além de manter alto o potencial mitocondrial das células (Figura 10, painel D).

Mocé et al. (2010a) constataram maior número de células com membrana plasmática íntegra no sêmen dos animais tratados com 1 ou 2 mg de ciclodextrina agregada ao colesterol / 120×10^6 sptz. Tomás et al. (2014) observaram que a porcentagem de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras foi superior em diluidores acrescidos de ciclodextrina nas quantidades de 12,5, 25 e 50 mg/ 500×10^6 espermatozoides, em suínos. Contudo, valores acima de 12,5 mg de ciclodextrina/ 500×10^6 espermatozoides mostraram grande redução na motilidade espermática.

Purdy e Graham (2004) observaram em bovinos um maior acúmulo do colesterol incorporado através da ciclodextrina nas membranas mitocondrial e acrossomal, sendo que esses podem ser sítios da ação protetora do colesterol incorporado.

Nos resultados do presente trabalho acerca da preservação do potencial mitocondrial contradizem os encontrados por Hussain et al. (2013), que observaram que em bisões, independente da concentração (0, 1, 2 ou 3 mg) de ciclodextrina não havia diferença entre as células que apresentavam alto potencial mitocondrial. O mesmo foi observado para equinos quando comparados os grupos tratados com 0 ou 1,5 mg de ciclodextrina (SPIZZIRRI et al., 2010)

Tais observações indicam um grande potencial da ciclodextrina acrescida de colesterol na preservação dessas membranas, assim como se mostra extremamente eficaz na manutenção da integridade da matriz mitocondrial.

6.4.4 O influxo de colesterol não influencia o estresse oxidativo

Não foi observada diferença em relação a formação de radicais superóxido ou hidroxila (Tabela 3) assim como não foram observadas diferenças entre os grupos na quantidade de células apresentando indicativos de peroxidação lipídica (Figura 11).

O uso do Cell ROX Deep Red® como indicador do estresse oxidativo foi bem validado e testado para carneiros (ALVES, 2014), sendo altamente eficaz em detectar mudanças na formação de radicais hidroxila e superóxido, marcando o espermatozoide. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas pela respiração aeróbica das células, causando perda da fluidez e integridade da membrana (AITKEN, 1995).

A peroxidação lipídica é a resultante de um estresse oxidativo pelo qual a célula tem uma desorganização de sua membrana, tornando-a uma célula inviável, por isso a detecção da mesma pode dar uma indicação da causa.

A peroxidação lipídica pode gerar como resultado uma perda na função espermática, devido a vários fatores como a inibição da geração de ATP perda da integridade e fluidez da membrana (AITKEN, 1995). Espermatozoides são altamente vulneráveis ao ataque de ROS, devido à baixa capacidade antioxidante citoplasmática e alto teor de ácidos graxos poliinsaturados da membrana (AITKEN & CURRY, 2011; DICKINSON & CHANG, 2011).

Contudo, os resultados mostram que o aumento do colesterol intracelular não influencia diretamente sobre os processos de estresse oxidativo, tanto no tocante a peroxidação lipídica quanto na produção de radicais livres.

6.4.5 A ciclodextrina incorporada ao colesterol não influencia no grau de desordem de membrana

A sonda Merocianina 540 cora com mais intensidade os espermatozoides com membranas com maior estado de desordem, o que é um dos grandes indicativos do processo de capacitação, por isso é importante a obtenção desses valores para indicar um processo de possível criocapacitação (ANDRADE et al, 2012).

O efluxo de colesterol na membrana da célula espermática é um evento extremamente importante para o início do processo de capacitação e ativação (OSHEROFF et al., 1999; VISCONTI, 1999). Em equinos foi observado que o tratamento com 1,5 mg de ciclodextrina mostrou maior número de células com alta fluidez de membrana observado pela sonda Merocianina 540 (MURPHY et al., 2014).

Contudo, os resultados do presente trabalho mostram que o influxo prévio de colesterol à célula foi semelhante em relação à adição ou não de CLC+CHO ao diluidor (Figura 12). Isso indica que estes espermatozoides estarão tão aptos a fertilizar quanto os diluídos em diluidor sem a adição de CLC+CHO. Esses achados são condizentes aos encontrados para touros, onde apesar de se esperar que o aumento do colesterol fosse retardar o processo de capacitação, não houve diferença entre o tempo de capacitação entre o grupo controle e o grupo tratado com ciclodextrina+colesterol (PURDY e GRAHAM, 2004).

Entretanto, nossos resultados se contrapõem aos encontrados para bovinos por Kato et al. (2011), no qual foi observado aumento das taxas de ativação.

Com isso, foi observado que a ciclodextrina acrescida de colesterol não foi eficaz em prevenir a capacitação causada pela criopreservação.

6.4.6 Ciclodextrina pura e a retirada do colesterol

Os resultados referentes ao tratamento com ciclodextrina pura podem ser explicados pela alta afinidade e seletividade da ciclodextrina pelo colesterol, e também pela concentração utilizada, o que pode levar a uma perda na qualidade do espermatozoide. Sanchez et al. (2011) observaram que o processo de remoção do colesterol é dependente da concentração de

ciclodextrina, e que em altas concentrações a Metil- β Ciclodextrina também remove fosfolípidos. Essa retirada em excesso do colesterol e fosfolípidos leva a morte celular.

Os parâmetros encontrados acerca do tratamento com ciclodextrina pura podem se relacionar principalmente a queda na viabilidade espermática, constatada pelo baixo número de células com membrana plasmática e acrossomal (Figura 10, painéis A, B e C) e pelo baixo potencial mitocondrial (Figura 10, painel D); perda agravante de movimentação, constatado pelos valores inferiores de motilidade e suas características (Tabela 1).

Segundo Jones et al. (2007) a remoção do colesterol das células pela ciclodextrina pura pode levar a mudanças relacionadas a capacitação, mas não alteram a difusão de lipídeos na célula; contudo, quando administrada em altas concentrações (50-100 mmol/L) essas imobilizam a difusão de lipídeos, causando prejuízos ao espermatozoide.

Os resultados suportam a afirmação de que a ciclodextrina é um potente mediador de efluxo de colesterol da membrana, que é um processo que dá início a ativação e capacitação do espermatozoide (VISCONTI et al., 1999; WATANABE; KONDOH, 2011), onde o uso de ciclodextrina mostrou menores valores de desorganização da membrana (Figura 12), contudo, também levou a morte celular.

Com isso, pode-se observar que a Metil- β -Ciclodextrina pura quando adicionada ao sêmen ovino na concentração de 2mg/10x⁶sptz leva a queda acentuada dos parâmetros de motilidade, potencial mitocondrial e integridade de membranas do sêmen pós-descongelamento, causando intensa morte celular devido a retirada massiva de colesterol.

6.5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a adição da ciclodextrina incorporada ao colesterol preserva melhor as características espermáticas de motilidade, integridade de membranas e potencial mitocondrial do sêmen criopreservado ovino. Entretanto, não altera a produção de espécies reativas de oxigênio, nem a fluidez das membranas.

7 CAPÍTULO 2 - A ADIÇÃO DE COLESTEROL INCORPORADO A CICLODEXTRINAMELHORA A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO DE BAIXA CONGELABILIDADE

7.1 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos, a criopreservação do sêmen ainda enfrenta grandes entraves, como a perda da viabilidade espermática pós-descongelação devido às alterações de osmolaridade e de conformação que o espermatozoide sofre (CURRY; WATSON, 1994; CELEGHINI et al., 2008). Este problema pode estar relacionado à técnica e ao tipo de diluidor.

No entanto, em grande parte o problema na definição de uma técnica de congelamento para cada espécie reside nas diferenças de congelabilidade entre animais (MOCÉ et al., 2010b) e até mesmo entre ejaculados (BENSON et al., 2012). Deve-se destacar que estas diferenças no potencial de congelabilidade do sêmen foram relatadas em ovinos (FISER e FAIRFULL, 1983; D'ALESSANDRO e MARTEMUCCI, 2003) e podem ser dependentes da época do ano, assim como dependente da idade (LYMBEROPOULOS et al., 2010).

A adição de colesterol incorporado a ciclodextrina a célula espermática tem sido amplamente utilizada em várias espécies animais, como suínos (ZENG; TERADA, 2001), bovinos (PURDY; GRAHAM, 2004), equinos (MOORE et al., 2005) e ovinos (MOCÉ et al., 2010a), com o intuito de aumentar o grau de preservação das membranas e a motilidade espermática. A adição de colesterol por meio da ciclodextrina interage aumentando a proporção colesterol:fosfolípidos das membranas, levando os espermatozoides a um estado similar àqueles que não sofrem com o choque térmico causado pela congelamento (MOCÉ et al., 2010b).

Com base nessas informações esse estudo teve por objetivo observar se a adição de colesterol incorporado a ciclodextrina tem efeito benéfico na criopreservação do sêmen ovino nas diferentes classes de congelabilidade.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Delineamento

Foram utilizados 30 ejaculados de ovinos, hígidos da raça White Dorper com idade entre 2 e 4 anos, mantidos em um mesmo piquete nas dependências do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga.

Cada ejaculado foi avaliado *in natura* (IN), criopreservado e novamente avaliado após a criopreservação. Os dados obtidos da qualidade do sêmen antes e após a criopreservação, utilizando um diluidor de uso comercial (controle), foram utilizados para dividir os ejaculados em três classes: alta congelabilidade, congelabilidade intermediária e baixa congelabilidade.

Para a divisão dessas classes foram consideradas a motilidade total pós-descongelação (MTPD) e a porcentagem de redução na motilidade total (%RMT), quando comparados o sêmen *in natura* com o sêmen pós-descongelação (somente diluidor). Os valores utilizados para a divisão dos grupos estão ilustrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros utilizados para a divisão dos grupos de congelabilidade

	<i>Baixa congelabilidade</i>	<i>Congelabilidade intermediária</i>	<i>Alta congelabilidade</i>
<i>%RMT</i>	$\geq 60\%$	$> 40\% \text{ e } < 60\%$	$\leq 40\%$
<i>MTPD</i>	$\leq 40\%$	$> 40\% \text{ e } < 60\%$	$\geq 60\%$

Cada ejaculado foi dividido em duas alíquotas para a administração dos tratamentos: controle (CON), sêmen acrescido somente de diluidor à base de gema de ovo (Botu-bov[®] - BothuPharma) (n=30), e tratado (CLC+CHO), sêmen acrescido de diluidor à base de gema de ovo juntamente com ciclodextrina agregada ao colesterol.

7.2.2 Colheita e Análises do Sêmen Pré-criopreservação

O sêmen foi colhido por vagina artificial com o auxílio de um tubo cônico graduado (14 mL) pré-aquecido (37° C), envolto em suporte de isopor para manter a temperatura. Logo após a colheita, o sêmen foi levado ao laboratório, mantido em banho-maria à temperatura de 37°C e avaliado considerando: odor, volume, cor, aspecto, motilidade, concentração, integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio.

7.2.2.1 Análise Subjetiva e Computadorizada do Sêmen

O volume, cor e aspecto do sêmen foram avaliados visualmente no tubo de colheita. A motilidade espermática foi avaliada utilizando-se o *software* Sperm Class Analyser (SCA – Microoptics Barcelona, Espanha), com ajuste prévio do setup para sêmen ovino (Anexo D). A imagem da amostra do sêmen diluído em meio TALP *sperm* (Anexo A) ($12,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL), depositado em câmara de Makler, foi obtida por uma câmera acoplada a um microscópio equipado com contraste de fase (Nikon, Modelo Eclipse Ni-U 80i). As análises foram feitas no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES-FMVZ/USP). Foram analisadas as características: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %) (Figura 13).

A concentração espermática foi realizada por meio da diluição do sêmen em formol salino 5% (Anexo B) na proporção 1:400, sendo colocado 5 μL de sêmen em 1995 μL de formol salino tamponado e a contagem de espermatozoides foi feita em câmara de Neubauer.

Figura 13 - Imagem gerada da tela do programa de análise computadorizada do sêmen (CASA) Sperm Class Analyzer (SCA)

Legenda: O trajeto vermelho representa os espermatozoides com motilidade progressiva rápida, em verde os espermatozoides com motilidade progressiva lenta, em azul os espermatozoides sem motilidade progressiva e em amarelo os espermatozoides imóveis.

Fonte: (BATISSACO, 2014)

7.2.2.2 Análises da membrana plasmática, acrossoma e potencial mitocondrial

As membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial foram avaliadas pela associação de sondas fluorescentes (Anexo C), descrita por Celeghini et al. (2010). Resumidamente, as amostras de sêmen foram diluídas em microtubos para se obter a concentração final de 25×10^6 sptz/mL, em seguida era retirada uma alíquota de 150 μ L, nos quais eram adicionados: 2 μ L de Hoescht 33342 (0,5 mg/mL, Molecular Probes), 3 μ L de iodeto de propídio (0,5 mg/mL, Sigma-Andrich), 50 μ L de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionado de fluoresceína (FITC-PSA, 100 μ g/mL, Sigma-Andrich) e 2 μ L de iodeto de 5,5',6,6'tetracoloro 1,1',3,3'tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1, 153 μ M, Sigma-Andrich). Essa amostra era incubada a 37° C por 8 minutos, com conseguinte leitura feita sob

microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon Tóquio, Japão) em aumento de 1.000 x (Figura 14), utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm).

Figura 14 – Espermatozoides ovinos corados pela técnica da tripla coloração descrita por Celeghini et al. (2010) de avaliação das membranas plasmáticas, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

Legenda: A: PIAIA (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta, alto potencial de membrana mitocondrial); em B: PIAIB (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta, baixo potencial de membrana mitocondrial); em C: PIALA (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada, alto potencial de membrana mitocondrial) em D: PIALB (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada, baixo potencial de membrana mitocondrial); em E: PLAIA (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta, alto potencial de membrana mitocondrial); em F: PLAIB (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta, baixo potencial de membrana mitocondrial); em G: PLALA (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada, alto potencial de membrana mitocondrial); e em H: PLALB (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada, baixo potencial de membrana mitocondrial)

Fonte (CELEGHINI et al., 2010)

7.2.3 Preparação da Ciclodextrina

A ciclodextrina de escolha foi a metil- β -ciclodextrina (M β CD), preparada na concentração de 2 mg de ciclodextrina/ 120×10^6 espermatozóides, como descrito para ovinos por Mocé et al. (2010a) e Purdy et al. (2010).

A CLC foi pré-carregada com colesterol para a preparação do complexo de CLC+CHO como descrito por Purdy e Graham (2004). A preparação do complexo CLC+CHO foi feita em um tubo de vidro, onde 200 mg de colesterol (cod. C3045-5g, Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio. Em um segundo tubo de ensaio, 1 g de Metil- β -ciclodextrina (C4555-10g, Sigma-Aldrich) foi dissolvida em 2 mL de metanol. Após essa etapa, uma alíquota de 0,45 mL da solução de colesterol foi adicionada à solução de ciclodextrina, e a mistura foi agitada com bastão de vidro até que a solução combinada tornou-se clara. A solução combinada de CLC+CHO foi então despejada em uma placa de Petri e os solventes foram retirados por meio de um fluxo de gás de nitrogênio. Os cristais resultantes foram deixados para secar por um período adicional de 24 h (22°C) e posteriormente retirados da placa de Petri e armazenados em um recipiente de vidro âmbar em congelador (-20°C) até sua utilização. Para facilitar a manipulação a CLC foi alíquotada em microtubos de 1,5 mL em alíquotas de 25; 12,5 e 10 mg de CLC determinadas em balança analítica de precisão.

Para incorporação do colesterol aos espermatozoides, foi preparada uma solução de trabalho por meio da adição de 10 mg de CLC+CHO a 200 μ L de meio diluidor Tris trabalho (TrisT) (200 mM Tris, 71 mM ácido cítrico, 55 mM Frutose, pH=7,4; 300 mOsm) sem diluidor, a 37°C e homogeneizada com agitador tipo vórtex, imediatamente antes de se acrescentar ao sêmen. Após a homogeneização foi adicionado à alíquota de sêmen apenas o volume calculado da solução de trabalho (dose 2 mg de CLC/ 120×10^6 spztz), e incubado por 15 min a 32°C.

A divisão da CLC (em pó) em alíquotas reduz o desperdício, uma vez que se pode diluir apenas a quantidade exata necessária para o volume e a concentração espermática da alíquota do ejaculado. Na diluição da CLC deve-se manter sempre a concentração de 10mg de CLC/mL na solução de trabalho (exemplo: 25 mg de CLC devem ser diluídos em 500 μ L de solução Tris-300mOsm).

7.2.4 Criopreservação do Sêmen

Após as análises, o sêmen foi dividido em duas alíquotas, nas quais foram acrescentados os dois tratamentos através do método de três etapas (3 *step*). Na 1ª etapa foram acrescentados ao sêmen (nos tubos identificados): solução de trabalho Tris (CON) ou Ciclodextrina + colesterol ressuspensos em solução de trabalho Tris (CLC+CHO).

Em seguida para a 2ª etapa foi acrescentado o diluidor comercial Botubov[®] na proporção de 1:1, onde se esperou um período de 10 minutos para a interação entre o sêmen e o diluidor. E na 3ª etapa foi colocado o restante do diluidor. A amostra foi então homogeneizada e envasada em palhetas francesas de 0,5 mL, identificadas com nome/número do animal, partida e tratamento.

Para a criopreservação do sêmen foi utilizado o aparelho portátil da marca Tetakon, TK 3000[®] (TK Tecnologia em Congelação Ltda., Uberaba, Minas Gerais, Brasil), composto por um aparelho programável, equipado com um porta-palhetas, um tubo de refrigeração e uma caixa térmica para nitrogênio líquido. Para a refrigeração, as palhetas foram colocadas no porta-palhetas, acondicionado no tubo de refrigeração, seguindo uma curva de -0,25°C/minuto até alcançar a temperatura de 5°C, com duração média de uma hora e 10 minutos. Em seguida, o porta-palhetas foi movido para a caixa térmica contendo nitrogênio líquido, onde foi iniciada uma curva de congelamento de -20°C/minuto até atingir -120°C, com duração média da curva de congelamento de 10 minutos. E por fim, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C). Após esse processo as palhetas foram acondicionadas em racks e armazenadas em botijões criogênicos para posterior análise.

7.2.5 Análise do Sêmen Pós-criopreservação

Para a análise do sêmen pós-criopreservação, duas palhetas de sêmen de cada tratamento foram descongeladas a 37°C por 30 segundos, homogeneizadas em um microtubo e mantidas em banho-Maria seco a 37°C. Foram analisadas as características de motilidade e vigor subjetivos sob microscopia de contraste de fase e motilidade computadorizada utilizando o SCA, como descrito para o sêmen *in natura*. Além destas avaliações, foram realizadas análises das membranas espermáticas, produção de espécies reativas de oxigênio e fluidez das

membranas utilizando a citometria de fluxo, bem como avaliação do potencial de membrana mitocondrial por microscopia de epifluorescência, como descrito a seguir.

7.2.5.1 Avaliações espermáticas por meio da técnica de citometria de fluxo

As análises por citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (FZEA-USP). Para tanto, as amostras para coloração e análise em citometria de fluxo foram diluídas no meio Tyrode'salbumina lactato piruvato (TALP (Anexo A)) (BAVISTER et al., 1983) ou em meio modificado de Tyrode's (TALPm) contendo 114 mM de NaCl, 3,2 mM de KCl, 0,5 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,4 mM de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 5 mM de glicose, 10 mM de lactato de sódio, 0,1 mM de piruvato de sódio, 10000 UI/100 mL de penicilina sódica. O pH do meio foi corrigido até 7,4 com o uso de NaOH 5 N. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACS Aria (Beckton-Dickeson, San Jose, USA) controlado pelo *software* BDFACSDiva 6.0 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA). As amostras passaram no instrumento com uma taxa de aquisição de aproximadamente 600-1000 eventos/s, sendo adquiridas de 5.000 a 10.000 células por análise. As células foram excitadas simultaneamente por um laser de argônio na faixa de 488 nm e por um laser Near UV na faixa de 375 nm.

7.2.5.1.1 Avaliação das membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo

As alíquotas retiradas das amostras foram adicionadas ao TALP sperm (Anexo A) em tubos de microcentrifugação (1,5 mL) pré-aquecidos a 37°C, a fim de se obter amostras com concentração de 5×10^6 espermatozoides por mL. A seguir, foi adicionado 2 µL da sonda Hoechst 33342 (H33342; 40 µg/mL, H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. O uso desta sonda teve como objetivo, corar o DNA das células espermáticas para que não haja a contagem de forma equivocada de partículas com o mesmo tamanho e granulidade do espermatozoide (DE ANDRADE et al., 2011). Passado o período de incubação, foram adicionados à amostra 3 µL de Iodeto de Propídio (IP-0,5 mg/mL, L0770, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, Missouri, EUA), conjuntamente com a adição de 10 µL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína

(FITC-PSA-100 $\mu\text{g/mL}$, L-0770, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, Missouri, EUA) estas sondas com os seguintes objetivos; corar as células com membrana plasmática lesada (IP positivo) e com a membrana acrossomal lesada (FITC-PSA positivo) (CELEGHINI et al., 2010) (Figura 15). Após 10 minutos de incubação a 37°C , os espermatozoides foram diluídos com a adição de 150 μL de TALPm e transferidos para tubos graduados até 15 mL (37°C). Com isso, as amostras apresentaram uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides por mL no momento de serem analisadas pela técnica de citometria de fluxo.

Figura 15 - Gráfico gerado pelo citometro de fluxo a partir do software FACSDiva 6.1, utilizando as sondas para integridade da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides ovinos pós descongelamento

Legenda: A) Pré-seleção espermática do tamanho e complexidade interna das células. B) Seleção da população Hoechst 33342 (H33342) positiva a partir da população pré-selecionada no gráfico A. C) Dotplot com quadrante que possibilita a divisão dos espermatozoides positivos para H33342 em quatro populações distintas: AIML – acrossoma íntegro e membrana plasmática lesionada; ARML – acrossoma reagido e membrana plasmática lesionada; AIMI – acrossoma e membrana plasmática íntegra; ARMI – acrossoma reagido e membrana plasmática íntegra. D) Tabela estatística gerada pelo software com o percentual de cada população analisada.

Fonte (BATISSACO, 2014)

7.2.5.1.2 Avaliação da produção de EROS por citometria de fluxo

Foram retiradas alíquotas de sêmen durante as etapas de análise a fim de obter amostras diluídas em TALPm com 5×10^6 espermatozoides/mL. Estas foram então coradas com 0,5 μ L da sonda C11-BODIPY581/591 (1 mg/mL, D-3861, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) por 30 minutos a 37°C (RAPHAEL, 2007). Passado o período de incubação, foram transferidas para outros microtubos 145 μ L destas soluções, agora, coradas com a sonda C11-BODIPY581/591. A estas amostras foram adicionados 2 μ L de Hoechst 33342 com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. Então, foram adicionadas as amostras 3 μ L de Iodeto de Propídio. Após 5 minutos de incubação a 37°C, os espermatozoides foram diluídos com a adição de 150 μ L de TALPm e transferidos para tubos graduados de 15 mL (37°C). Com isso, as amostras apresentaram uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides por mL no momento de serem analisadas por citometria de fluxo. Na Figura 16 estão exemplos dos gráficos gerados a partir das amostras coradas pela sonda C11-BODIPY581/591.

Figura 16 – Gráfico gerado pelo citometro de fluxo a partir do software FACSDiva 6.1, utilizando a sonda para estresse oxidativo (BODIPY) dos espermatozoides ovinos pós descongelamento

Legenda: A) Pré-seleção espermática através do tamanho e complexidade interna das células. B) Seleção da população Hoechst 33342 (H33342) positiva a partir da população pré-selecionada no gráfico A. C) Dotplot com a separação das células positivas (mortas) e negativas (vivas) para Iodeto de Propídio. D) Histograma de FITC-A (fotomultiplicador longpass 502 e bandpass 530/15) gerado a partir das células vivas. E) Mediada da intensidade de fluorescência das células positivas para o a sonda fluorescente C11-Bodipy581/591.

Fonte (BATISSACO, 2014)

7.2.5.1.3 Avaliação da fluidez da membrana plasmática por citometria de fluxo

Para a análise da estabilidade da membrana plasmática pela técnica de citometria de fluxo (FLESCH et al., 1999), as amostras foram incubadas em solução de TALPm na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL em um volume final de 147 μ L. Foram então adicionados 2 μ L de Hoechst 33342 com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. Em seguida 0,5 μ L da sonda fluorescente Yo-Pro-1 foi adicionada à amostra (7,5 μ M-MolecularProbes Inc., Eugene, Oregon, EUA) obtendo-se uma concentração final de 25 nM. A membrana plasmática íntegra é impermeável ao Yo-Pro-1, o qual se liga ao DNA das células com a membrana plasmática lesada. Então, a amostra foi incubada por 20 minutos e posteriormente adicionada da sonda fluorescente Merocianina 540 (810 μ M-MolecularProbes Inc., Eugene, Oregon, EUA) a fim de se obter uma concentração de 2,7 μ M em uma solução final de 150 μ L, em seguida estas foram incubadas por 70 segundos. Foram então diluídas em 150 μ L de TALPm e analisadas por citometria de fluxo, no qual foram avaliadas as porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (Yo-Pro-1 negativo) com aumento na desordem da bicamada lipídica (Merocianina 540 positivo) (Figura 17).

Figura 17- Gráficos gerado pelo citometro de fluxo a partir do software FACSDiva 6.1, utilizando a sonda para capacitação dos espermatozoides ovinos pós descongelção

Legenda: A) Pré-seleção espermática através do tamanho e complexidade interna das células. B) Seleção da população Hoechst 33342 (H33342) positiva a partir da população pré-selecionada no gráfico A. C) Dotplot com a separação das células positivas (mortas) e negativas (vivas) para Yo-pro1. D) Histograma de PE-A (fotomultiplicador longpass 595 e bandpass 610/20nm) gerado a partir das células vivas. E) Mediada da intensidade de fluorescência das células positivas para Merocianina-540.

Fonte (BATISSACO, 2014)

7.2.5.2 Avaliação do potencial mitocondrial por Microscopia de Epifluorescência

Foi analisado o potencial mitocondrial adicionando-se 2 μ L de Hoescht 33342 (0,5 mg/mL, Molecular Probes) e 6 μ L de iodeto de 5,5',6,6'tetracloro 1,1',3,3'tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1, 153 μ M, Sigma-Andrich). As amostras foram incubadas a 37° C por 8 minutos, com conseguinte leitura feita sob microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon Tóquio, Japão) em aumento de 1.000X.

7.2.6 Análise Estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias. Quando a normalidade e/ou homogeneidade do teste foi significativa ($P < 0,05$), os dados foram transformados e reavaliados. As comparações foram realizadas por análise de variância (ANOVA) em arranjo fatorial 3 X 3 (Tratamento CLC+CHO, CON e *in natura* X grupos alta, intermediária e baixa congelabilidade), tendo como efeitos principais os tratamentos (IN, CON e CLC-CHO) e os grupos de congelabilidade (alta, intermediária e baixa). As análises foram realizadas pelo procedimento misto (PROC MIXED) do SAS (Versão 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Quando apenas os efeitos principais foram estatisticamente significativos (sem interação significativa), as comparações foram realizadas através do Teste de Tukey. Quando foi observada interação significativa, as médias foram então separadas pelo procedimento PDIFF do SAS. Dados que, mesmo após transformação, continuaram sendo significativos nos testes de normalidade e/ou homogeneidade, foram analisados por estatística não-paramétrica de ordem (Teste de Kruskal-Wallis). A probabilidade de $P \leq 0,05$ foi considerada como diferença significativa e probabilidade entre $P > 0,05$ e $\leq 0,1$ foi considerada como diferença aproximando-se de ser significativa (tendência estatística). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), a não ser por indicação contrária.

7.3 RESULTADOS

Dentre os parâmetros de motilidade subjetiva foi observada uma notória diferença entre os grupos de alta, intermediária e baixa congelação com grande queda no grupo CON em relação ao grupo CLC+CHO e IN, sendo essa queda maior no grupo de baixa congelabilidade (Figura 18). O mesmo pode ser observado para a motilidade total atingiu valores abaixo de 30% pós-descongelação, padrões abaixo dos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013) para sêmen ovino descongelado (Figura 18, Painel B).

Contudo, o tratamento com ciclodextrina se mostrou eficaz na melhor preservação desses espermatozoides, constatado pelos parâmetros de motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e células rápidas nos grupos de congelabilidade intermediária e congelabilidade baixa (Figura 18, Painéis A, B, C e D).

O grupo de congelabilidade intermediária apresentou valores estatisticamente iguais entre o sêmen tratado com CLC+CHO e o *in natura* no quesito motilidade total (Figura 18, Painel B), mostrando seu grande poder de preservação.

Não houve diferença estatística entre o tratamento e o controle em relação aos valores de velocidade curvilinear e velocidade de trajeto em nenhum dos grupos, somente houve entre o sêmen *in natura* e os grupos tratamento e controle.

Figura 18 - Médias $\pm$ erro padrão das características espermáticas de motilidade (subjéctiva e CASA) avaliadas em ejaculados de carneiros em diferentes grupos de congelabilidade (alta, intermediária e baixa) e diferentes tratamentos (sêmen *in natura*, sêmen pós-descongelção dos grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor) e CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol))

a,b,c Pontos com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) dentro do tratamento.

A,B,C Pontos com letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) dentro do grupo.

Legenda: Painel A: Motilidade subjéctiva (MOTSUB, %). Painel B: Motilidade total (MOTTOT, %). Painel C: Motilidade progressiva (MOTPRO, %). Painel D: Células rápidas (RAP, %). Painel E: Velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$). Painel F: Velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$). Os tratamentos estão apresentados como: (●) Sêmen *in natura*. (■) Controle (CON). (◇) Sêmen tratado com ciclodextrina e colesterol (CLC-CHO). Probabilidades para efeito de tratamento (T), grupo (G) ou interação tratamento x grupo (TG) que foram estatisticamente significativos ou que apresentaram tendência de diferença estatística estão apresentados.

Os parâmetros de vigor, velocidade progressiva, linearidade e retilinearidade não diferiram entre os grupos controle e tratado, sendo somente notável a diminuição de ambos em

relação ao sêmen *in natura*, com exceção da retilinearidade onde o grupo controle não diferiu quando comparado ao sêmen *in natura*, também quando comparado ao grupo tratado (Tabela 5). Os parâmetros de ALH e BCF não apresentaram diferença estatística entre tratamentos.

Observou-se que o grupo de baixa congelabilidade apresentou valores mais baixos para vigor e velocidade progressiva quando comparado aos grupos de intermediária e alta congelabilidade. No entanto, não se observou diferença estatística entre os grupos em relação à linearidade, retilinearidade, deslocamento lateral de cabeça e frequência de batimento (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias $\pm$ erro padrão das características de movimento espermático avaliados pelo CASA de ejaculados de carneiros em diferentes grupos de congelabilidade (alta, intermediária e baixa) e diferentes tratamentos (sêmen *in natura*, sêmen pós-descongelção dos grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor) e CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol))

Grupo	Tratamento	Características espermáticas					
		Vigor (1-5)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
ALTA	IN	4.25 $\pm$ 0.14	120.37 $\pm$ 4.00	80.67 $\pm$ 1.63	87.25 $\pm$ 1.34	2.59 $\pm$ 0.15	9.08 $\pm$ 0.36
	CON	2.95 $\pm$ 0.10	80.98 $\pm$ 2.92	71.66 $\pm$ 1.14	83.04 $\pm$ 0.64	2.75 $\pm$ 0.05	8.62 $\pm$ 0.16
	CLC+CHO	2.95 $\pm$ 0.10	82.44 $\pm$ 3.30	73.24 $\pm$ 1.49	83.92 $\pm$ 1.17	2.73 $\pm$ 0.06	8.91 $\pm$ 0.18
INTERME-DIÁRIA	IN	4.35 $\pm$ 0.19	118.5 $\pm$ 7.29	80.74 $\pm$ 1.93	87.13 $\pm$ 1.42	2.40 $\pm$ 0.12	8.77 $\pm$ 0.36
	CON	2.80 $\pm$ 0.08	77.15 $\pm$ 6.72	75.15 $\pm$ 1.76	86.37 $\pm$ 1.11	2.62 $\pm$ 0.09	8.67 $\pm$ 0.27
	CLC+CHO	3.00 $\pm$ 0.14	77.51 $\pm$ 6.24	73.47 $\pm$ 2.05	84.71 $\pm$ 1.36	2.59 $\pm$ 0.08	9.26 $\pm$ 0.30
BAIXA	IN	4.18 $\pm$ 0.23	115.03 $\pm$ 6.10	82.00 $\pm$ 1.63	88.34 $\pm$ 1.60	2.39 $\pm$ 0.12	9.41 $\pm$ 0.46
	CON	2.00 $\pm$ 0.22	48.14 $\pm$ 8.99	74.03 $\pm$ 2.92	86.91 $\pm$ 1.40	2.50 $\pm$ 0.07	9.14 $\pm$ 0.44
	CLC+CHO	2.35 $\pm$ 0.32	60.30 $\pm$ 9.95	75.90 $\pm$ 2.58	85.33 $\pm$ 2.07	2.14 $\pm$ 0.13	8.85 $\pm$ 0.38
Efeitos principais							
Tratamentos							
IN		4.26 $\pm$ 0.10 ^a	118.35 $\pm$ 3.24 ^a	81.05 $\pm$ 0.98 ^a	87.50 $\pm$ 0.81 ^a	2.47 $\pm$ 0.08	9.07 $\pm$ 0.22
CON		2.68 $\pm$ 0.10 ^b	70.94 $\pm$ 4.22 ^b	73.43 $\pm$ 1.04 ^b	85.12 $\pm$ 0.64 ^{ab}	2.65 $\pm$ 0.04	8.76 $\pm$ 0.15
CLC+CHO		2.82 $\pm$ 0.11 ^b	74.89 $\pm$ 3.85 ^b	73.96 $\pm$ 1.10 ^b	84.56 $\pm$ 0.83 ^b	2.53 $\pm$ 0.06	9.01 $\pm$ 0.15
Grupos							
ALTA		3.41 $\pm$ 0.12 ^A	94.60 $\pm$ 3.63 ^A	75.19 $\pm$ 1.04	84.74 $\pm$ 0.68	2.69 $\pm$ 0.05 ^A	8.87 $\pm$ 0.14
INTERMEDIÁRIA		3.38 $\pm$ 0.15 ^A	91.08 $\pm$ 5.22 ^A	76.45 $\pm$ 1.21	86.07 $\pm$ 0.75	2.54 $\pm$ 0.06 ^B	8.90 $\pm$ 0.18
BAIXA		2.95 $\pm$ 0.26 ^B	74.49 $\pm$ 7.67 ^B	77.52 $\pm$ 1.51	86.85 $\pm$ 0.99	2.33 $\pm$ 0.07 ^B	9.13 $\pm$ 0.24
Média Geral ($\pm$ E.P.M.)		3.28 $\pm$ 0.10	88.06 $\pm$ 3.14	76.20 $\pm$ 0.704	85.74 $\pm$ 0.46	2.55 $\pm$ 0.039	8.95 $\pm$ 0.10
Probabili-dades (p)	Tratamento	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0,0181	0,2048	0,6061
	Grupo	0,0026	0,0002	0,325	0,1115	0,0001	0,6464
	Interação	0,2688	0,149	0,7069	0,6048	0,3174	0,618

^{a,b,c} Colunas com letras sobresscritas minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$), dentro de tratamentos, pelo teste de Tukey.

^{A,B,C} Colunas com letras sobresscritas maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$), dentro de grupos, pelo teste de Tukey.

Legenda: vigor (subjetivo, escores 1-5), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm) e frequência de batimento (BCF, Hz). Os dados estão apresentados como características espermáticas e seus valores de tratamento dentro de cada grupo e efeitos principais de tratamento ou de grupo. Probabilidades para efeito de tratamento, grupo ou interação tratamento x grupo também são apresentados.

Os espermatozoides integros representados por células com membrana plasmática e acrossomo íntegros (PIAI) apresentaram diferença entre tratamentos, sendo que se apresentou maior no sêmen *in natura*, e, por conseguinte o tratamento CLC+CHO, e com CON com menor percentual de células PIAI. Também foi observado efeito de grupo, sendo que o sêmen de alta congelabilidade mostrou tendência estatística a ser maior que o de intermediária congelabilidade, e o sêmen de baixa congelabilidade mostrou-se abaixo de ambos (Tabela 6).

Com relação à integridade da membrana plasmática (MI) como fator separado pode-se observar o tratamento CLC+CHO foi mais eficaz em preservar a integridade dessa membrana, quando comparado ao grupo CON. Ambos obtiveram valores reduzidos em relação ao sêmen *in natura* (Tabela 6). Também foi possível observar efeito de grupo, onde o sêmen de alta congelabilidade mostrou tendência estatística a ser maior que o de intermediária congelabilidade, e o sêmen de baixa congelabilidade mostrou-se abaixo de ambos.

No tocante a preservação da integridade do acrossoma, pode-se observar que o grupo tratado teve ótima eficiência e se equiparou estatisticamente ao sêmen *in natura*, já o grupo CON foi menor que ambos. Quando comparados os grupos encontrou-se que os grupos de alta e intermediária congelabilidade não diferiam entre si e eram maiores que o grupo de baixa congelabilidade (Tabela 6).

Quanto ao potencial mitocondrial, observou-se que apesar de o tratamento CLC+CHO apresentar diferença estatística do sêmen *in natura*, numericamente a preservação oferecida pelo tratamento é próxima ao sêmen *in natura*, e estatisticamente maior quando comparada ao controle (Tabela 6). Quando comparado entre os grupos observou-se que os grupos de alta e intermediária congelabilidade não diferiam entre si e apresentavam valores maiores que o grupo de baixa congelabilidade.

Tabela 6 - Médias $\pm$ erro padrão das características espermáticas de membranas avaliadas em ejaculados de carneiros em diferentes grupos de congelabilidade (alta, intermediária e baixa) e diferentes tratamentos (sêmen *in natura*, sêmen pós-descongelação dos grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor) e CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol))

Grupos	Tratamentos	Características espermáticas			
		PIAI (%)	MI (%)	AI (%)	APMM (%)
ALTA	IN	70.50 $\pm$ 3.07	72.62 $\pm$ 3.04	71.75 $\pm$ 2.94	71.08 $\pm$ 3.22
	CON	15.41 $\pm$ 1.78	15.95 $\pm$ 1.76	47.41 $\pm$ 2.68	41.96 $\pm$ 6.36
	CLC-CHO	32.65 $\pm$ 3.08	33.05 $\pm$ 3.13	72.93 $\pm$ 1.96	58.83 $\pm$ 7.00
INTERMEDIÁRIA	IN	65.30 $\pm$ 3.55	66.65 $\pm$ 3.63	66.45 $\pm$ 3.30	64.75 $\pm$ 4.15
	CON	12.88 $\pm$ 2.33	13.07 $\pm$ 2.33	40.69 $\pm$ 4.45	34.05 $\pm$ 4.83
	CLC-CHO	26.91 $\pm$ 3.62	27.15 $\pm$ 3.64	65.81 $\pm$ 4.73	57.30 $\pm$ 5.69
BAIXA	IN	61.31 $\pm$ 4.97	62.87 $\pm$ 4.97	64.50 $\pm$ 5.37	61.68 $\pm$ 5.19
	CON	5.90 $\pm$ 2.75	6.21 $\pm$ 2.78	29.23 $\pm$ 6.89	21.87 $\pm$ 6.71
	CLC-CHO	14.10 $\pm$ 3.99	14.92 $\pm$ 4.26	50.47 $\pm$ 4.16	30.73 $\pm$ 8.58
Efeitos principais					
Tratamentos					
IN		66.31 $\pm$ 2.19 ^a	68.03 $\pm$ 2.21 ^a	68.05 $\pm$ 2.15 ^a	66.46 $\pm$ 2.37 ^a
CON		12.03 $\pm$ 1.42 ^c	12.39 $\pm$ 1.43 ^c	40.32 $\pm$ 2.83 ^b	33.97 $\pm$ 3.70 ^c
CLC-CHO		25.79 $\pm$ 2.39 ^b	26.25 $\pm$ 2.42 ^b	64.57 $\pm$ 2.61 ^a	50.83 $\pm$ 4.54 ^b
Grupos					
ALTA		39.52 $\pm$ 4.17 ^{A,*}	40.54 $\pm$ 4.29 ^{A,*}	64.03 $\pm$ 2.45 ^A	57.29 $\pm$ 3.81 ^A
INTERMEDIÁRIA		35.03 $\pm$ 4.49 ^{B,*}	35.62 $\pm$ 4.58 ^{B,*}	57.65 $\pm$ 3.23 ^A	52.03 $\pm$ 3.66 ^A
BAIXA		27.10 $\pm$ 5.55 ^C	28.00 $\pm$ 5.66 ^C	48.07 $\pm$ 4.31 ^B	38.10 $\pm$ 5.23 ^B
Média Geral ($\pm$ E.P.M.)		34.71 $\pm$ 2.70	35.55 $\pm$ 2.77	57.64 $\pm$ 1.95	50.42 $\pm$ 2.51
Probabilidade (p)	Tratamento	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
	Grupo	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0,001
	Interação	0,463	0,5431	0,374	0,4071

^{a,b,c} Colunas com letras sobrescritas minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$), dentro de tratamentos, pelo teste de Tukey.

^{A,B,C} Colunas com letras sobrescritas maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$), dentro de grupos, pelo teste de Tukey.

* Colunas com asterisco sobrescrito indicam tendência de diferença estatística entre grupos especificados ($P \leq 0,1$).

Legenda: para os parâmetros de PIAI (espermatozoides apresentando características de membrana plasmática íntegra e acrossomo íntegro), MI (espermatozoides apresentando características de membrana plasmática íntegra), AI (espermatozoides apresentando características de acrossomo íntegro), APMM (espermatozoides apresentando características de alto potencial de membrana mitocondrial). Os dados estão apresentados como características espermáticas e seus valores de tratamento dentro de cada grupo; e efeitos principais de tratamento ou de grupo. Probabilidades para efeito de tratamento, grupo ou interação tratamento x grupo também são apresentados.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos tanto para a peroxidação lipídica (C11-BODIPY) quanto para a criocapacitação espermática (Merocianina 540) (Figura 19, painel A).

Contudo, quando comparados, observou-se que o grupo de congelabilidade intermediária possuía maior grau de peroxidação, seguido pelo grupo de alta e por fim o grupo de baixa congelabilidade (intermediária > alta > baixa). Quanto à capacitação espermática

observou-se uma tendência estatística do grupo de congelabilidade intermediária ser maior que o de alta, e ambos foram maiores que o grupo de baixa (Figura 19, painel B).

Figura 19 - Médias ($\pm$ E.P.M.) das características de peroxidação lipídica e capacitação espermática avaliadas em ejaculados de carneiros em diferentes grupos de congelabilidade (alta, intermediária e baixa) e diferentes tratamentos (sêmen pós-descongelção dos grupos de tratamento CON (Controle, apenas diluidor) e CLC+CHO (diluidor acrescido de ciclodextrina + colesterol))

^{a,b,c} Barras com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) dentro da característica avaliada.

* Barras com asterisco sobrescrito indicam tendência de diferença estatística ($P < 0,1$) entre grupos especificados.

Legenda: Painel A: Efeito principal de tratamento. Painel B: Efeito principal de grupo.

7.4 DISCUSSÃO

O Tratamento com ciclodextrina pode ser apontado, de acordo com esse estudo, como um tratamento do sêmen comercialmente viável para as diferentes classes de congelabilidade, que são dependentes da variação entre cada animal e cada ejaculado.

Os parâmetros de motilidade oferecidos pelo sistema CASA junto com as avaliações tradicionais de sêmen oferecem grandes informações a respeito da qualidade do sêmen antes e após a congelação (DORADO et al., 2009; 2010). Os resultados da melhor preservação das características de motilidade total, motilidade progressiva, porcentagem de células rápidas e deslocamento lateral de cabeça (Figura 18) foram observados para todos os grupos quando adicionado ao diluidor colesterol incorporado por ciclodextrina, o que se mostra consistente com a grande maioria dos trabalhos em bovinos (MOCÉ e GRAHAM, 2006), asininos (ÁLVAREZ et.al., 2006), ovinos (MOCÉ et.al., 2010a; PURDY et.al., 2010) e ratos (LOOMIS e GRAHAM, 2008).

Foi observado que no grupo de congelabilidade intermediária o tratamento CLC+CHO conseguiu manter a motilidade total estatisticamente igual aos do sêmen *in natura*, o que mostra a efetividade do tratamento nesse grupo. Além disso, aumentou significativamente a motilidade do grupo de baixa congelabilidade, aumentando os parâmetros e viabilizando o sêmen para comercialização. Hartwig et al. (2014) observaram que, em equinos que apresentam sêmen de baixa congelabilidade, quando o sêmen foi congelado com 1,5 mg de ciclodextrina/ 120×10^6 espermatozoides todas as características de motilidade total, motilidade progressiva, VAP, VCL, VSL e células rápidas foram significativamente maiores quando comparados ao sêmen com somente diluidor, além de atingirem valores muito próximos do sêmen antes da congelação.

Motamedi-Mojdehi et al. (2013) já haviam observado que o tratamento com ciclodextrina apresentou melhores valores para motilidade e integridade de membranas em espermatozoides ovinos. Contudo, em equinos o tratamento com colesterol não alterou as taxas de motilidade progressiva quando comparadas ao controle, mas mostrou grande proteção na integridade de membranas acrossomal e plasmática (OLIVEIRA et al., 2010).

O processo de criopreservação do sêmen leva a um alto grau de lesão das membranas plasmáticas e acrossomal e a uma grande queda no potencial mitocondrial (CELEGHINI et al., 2008). Isso pode ser observado ao comparar os mesmos dados de integridade de membrana do grupo controle em relação ao sêmen *in natura*, onde se constatou grande queda dos parâmetros pós-congelação desse grupo (Tabela 6).

O influxo de colesterol através da ciclodextrina aumenta eficientemente o grau de preservação das membranas plasmática e acrossomal em carneiros (MOCÉ et al., 2010a) e em suínos (TOMÁS et al., 2014). O uso do colesterol mantém maior taxa de preservação de integridade de membranas em ganhos de baixa congelabilidade, aproximando-se aos valores encontrados no sêmen pré-congelado (HARTWIG et al., 2014). Nossos resultados se destacam pelo alto potencial de preservação da membrana acrossomal do tratamento CLC+CHO (Tabela 6), sendo que os valores do grupo tratado se igualam estatisticamente com os do sêmen *in natura*.

A adição de colesterol através da ciclodextrina ao diluidor de criopreservação faz com que haja influxo de colesterol para toda a célula espermática, contudo, o maior aumento de colesterol se dá nas mitocôndrias, ou seja, na peça intermediária (PURDY; GRAHAM, 2004). Esse fato vai de encontro com os dados obtidos, onde houve grande aumento na proteção do potencial de mitocôndria (Tabela 6), principalmente nos grupos de alta e intermediária congelabilidade.

Maia et al. (2010) mostraram que as espécies reativas de oxigênio no sêmen de carneiros se formam a partir do momento da adição do diluidor e também durante o processo de congelamento. Pode-se constatar uma clara diferença entre os grupos quanto à peroxidação lipídica, o que nos mostra que o grupo de baixa congelabilidade está sobre menor grau de estresse oxidativo e o grupo intermediária com o maior grau (Figura 19). Gómez-Fernández et al. (2013) constataram que em suínos, quando divididos em grupos de bons e maus congeladores, não houve diferença entre os grupos nos quesitos formação de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica, apesar do grupo alta apresentar maior número de células com membrana intacta, apresentando maior número de células vivas, e teoricamente, maior produção de EROS.

Em equinos o uso do colesterol incorporado a ciclodextrina provoca uma queda no número de células que entram em processo de capacitação pós-descongelamento (HARTWIG et al., 2014), isso acontece em equinos devido ao fato de que o tratamento com ciclodextrina aumenta a estabilidade e modifica a resposta aos indutores de capacitação (SPIZZIRI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

O mesmo não se observou em ovinos, no qual as taxas de capacitação espermática não se diferenciaram entre os tratamentos; contudo, quando comparados os grupos de congelabilidade observou-se que o grupo de baixa congelabilidade tinha menor grau de capacitação em relação aos demais grupos, e que o grupo de alta apresentou uma tendência estatística ter menores valores quando comparado ao grupo de intermediária (Figura 19).

Acredita-se que essa menor taxa de células capacitadas no grupo baixa deve-se ao menor número de células viáveis pós-descongelamento em comparação aos outros grupos que mantiveram padrões de células viáveis próximas ao sêmen *in natura*.

A coleta do sêmen depende da época do ano e do genótipo, em bovinos há grandes diferenças nos padrões do sêmen, e muitos ejaculados considerados de baixa qualidade são considerados impróprios para comercialização e eliminados (KOIVISTO et al., 2009). Nossos resultados mostram que o uso do colesterol incorporado a ciclodextrina aumenta a viabilidade dos espermatozoides congelados, especialmente para indivíduos de baixa congelabilidade, o que viabiliza seu uso comercial.

7.5 CONCLUSÃO

O tratamento com colesterol incorporado a ciclodextrina aumenta a viabilidade espermática em todas as classes de sêmen de acordo com o potencial de congelabilidade dos ejaculados em ovinos, sendo mais evidente a melhora nos grupos de baixa e intermediária congelabilidade.

8 CONSIDERAIS FINAIS

Em apreciação aos resultados obtidos durante a realização dos experimentos é possível considerar que o tratamento com colesterol incorporado a ciclodextrina ajuda a melhor preservar a viabilidade do sêmen ovino pós-descongelação; contudo, o tratamento não provoca influência sobre o estresse oxidativo e a capacitação induzida pela congelação. Ainda pode-se inferir que o tratamento com aumenta a taxa de preservação das características espermáticas independentemente da classe de congelabilidade do sêmen, mas esta destaca-se para o grupo de intermediária congelabilidade, no qual os parâmetros de motilidade total e integridade da membrana acrossomal se igualam estatisticamente ao sêmen *in natura*. Sobretudo, pode-se verificar que o tratamento com colesterol incorporado a ciclodextrina melhora as taxas de motilidade total do grupo de baixa congelabilidade pós-descongelação, ficando essas acima de 30%, valor mínimo preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013) para comercialização do sêmen ovino, o que viabiliza o uso do sêmen desses animais a campo. Adicionalmente é necessário realizar um teste de fertilidade para constatar a total viabilidade deste tratamento em ovinos.

REFERÊNCIAS

- ABDULKAREEM, T. A.; AL-HABOBY, A. H.; AL-MJAMEI, S. M.; HOBI, A. A. Sperm abnormalities associated with vitamin A deficiency in rams. **Small Ruminant Research**, v. 57, p. 67–71, fev. 2005.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, p. 963–974, 2005.
- AHN, H.-Y.; FAIRFULL-SMITH, K. E.; MORROW, B. J.; LUSSINI, V.; KIM, B.; BONDAR, M. V.; BOTTLE, S. E.; BELFIELD, K. D. Two-photon fluorescence microscopy imaging of cellular oxidative stress using profluorescent nitroxides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 10, p. 4721–4730, 2012.
- AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659–668, 1995.
- AITKEN, R. J.; CURRY, B. J. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. **Antioxidant Redox Signal**, v. 14, p. 367–381, 2011.
- AITKEN, R. J.; JONES, K. T.; ROBERTSON, S. A. Reactive oxygen species and sperm function in sickness and in health. **Journal of Andrology**, v. 33, p. 1096–1106, 2012.
- AKSOYA, M.; AKMANB, O.; LEHIMCIOĞLU, N. C.; ERDEMD, H. Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 120, 1p. 66–172, 2010.
- ÁLVAREZ, A. L.; SERRES, C.; TORRES, P.; CRESPO, F.; MATEOS, E.; GÓMEZ-CUÉTARA, C. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. In: EVANS, M. J (Ed.). *Proceedings of the Ninth International Symposium on Equine Reproduction – Equine Reproduction IX*, Rolduc Monastery, Kerkrade, The Netherlands. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 89–91, 2006.
- ALVES, M. B. R. **Tratamento da degeneração testicular em carneiros com suplementação de vitamina A ou laserterapia de baixa intensidade. 2014.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2014.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. Validation of a system for computerized measurement of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 647–656, 1980.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 397–406, 1993.

ANDRADE, A. F. C. **Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em espermatozoides criopreservados de equinos.** Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ANDRADE, A. F.C.; ZAFFALON, F. G.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, F.; BRESSAN, F. F.; MARTINS, S. M. M. K.; ARRUDA, R. P. Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. **Theriogenology**, v. 77, p. 1866–1872, 2012.

ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E.; DE PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 30-42, 2006.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.

ASHWORTH, P. J. C.; HARRISON, R. A. P.; MILLER, N. G. A.; PLUMMER, J. M.; WATSON, P. F. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, p. 173–180, 1994.

AURICH, K. L. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65-75, 2005.

AVELDANO, M. I.; ROTSTEIN, N. P.; VERMOUTH, N. T. Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmalogen phospholipids containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-3 series. **The Biochemical Journal**, v. 283, p. 235–241, 1992.

AWAD, M. M. Effects of sub-optimal glycerol concentration and cholesterol-loaded cyclodextrin in a Tris-based diluent on cryopreserved ram sperm longevity and acrosomal integrity. **Small Ruminant Research**, v. 100, p. 164– 168, 2011.

AWANO, M.; KAWAGUCHI, A.; MOHRI, H. Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 375–383, 1993.

BAILEY, J.; MORRIER, A.; CORMIER, N. Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, p. 393–401, 2003.

BAILEY, J.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 1–7, 2000.

BAKER, M. A.; HETHERINGTON, L.; AITKEN, R. J. Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 3182-3192, 2006.

BARRANCO, I.; ORTEGA, M. D.; MARTINEZ-ALBORCIA, M. J.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J. Season of ejaculate collection influences the freezability of boar spermatozoa. **Cryobiology**, v. 67, n. 3, p. 299-304, 2013.

BAVISTER, D.; LORRAINE, M. Development of preimplantation in a defined embryos of the golden culture medium. **Biological Trace Element Research**, v. 28, p. 235-247, 1983.

BENSON, J. D.; WOODS, E. J.; WALTERS, E. M.; CRITSER, J. K. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1682-1699, 2012.

BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SILVA MAIA, M. S.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, s. 11, p. 127-130, 2005.

BOERKE, A.; TSAI, P. S.; GARCIA-GIL, N.; BREWIS, I. A.; GADELLA, B. M. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 70, p. 1188-1196, 2008.

BOYERS, S. P.; DAVIS, R. O.; KATZ, D. F. Automated semen analysis. **Current Problems in Obstetrics, Gynecology, and Fertility**, v. 12, p. 167-200, 1989.

BROUWERS, J. F. H. M.; GADELLA, B. M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 1382-1391, 2003.

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

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.

CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 536-543, 2010.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 6, sup. 2, p. 329-357, 2005.

COURTENS, J. L.; PAQUIGNON, M. Ultrastructure of fresh, frozen and frozen-thawed spermatozoa of the boar. In: Proceedings of the First International Conference on Deep Freezing of Boar Semen, 1., 1985, Sweden. **Proceedings...** Uppsala, Sweden : Swedish University of Agricultural Sciences, 1985. p. 61-87.

CHRISTENSEN, P.; LABOURIAU, R.; BIRCH, A.; BOE-HANSEN, G. B.; PEDERSEN, J.; BORCHERSEN, S. Relationship among seminal quality measures and field fertility of young dairy sires using low-dose inseminations. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 1744–1754, 2011.

CROCKETT, E. L. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. **American Zoologist**, v. 38, p. 291–304, 1998.

CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 7–11, 1998.

CURRY, M. R.; WATSON, P. F. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. **Cryobiology**, v. 31, p. 39-46, 1994.

DAVIS, B. K. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. **Archive of Andrology**, v. 5, p. 249-254, 1980.

D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 1-2, p. 93-102, 2003.

DE ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M. M. K.; RAPHAEL, C. F.; MORETTI, A. S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 190-194, 2007.

DE ANDRADE, A. F. C.; ZAFFALON, F. G.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; TARRAGÓ, O. F. B.; MARTINS, S. M. M. K.; ALONSO, M. A.; ARRUDA, R. P. Addition of seminal plasma to post-thawing equine semen: What is the effect on sperm cell viability? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 682-686, 2011.

DE LAMIRANDE, E; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, p. 157-166, 1993a.

DE LAMIRANDE, E; GAGNON, C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 16, p. 21-25, 1993b.

DICKINSON, B. C.; CHANG, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature Chemical Biology**, v. 7, p. 504–511, 2011.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A. E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; DEL OLMO, E.; BISBAL, A. F.; ROS-SANTAELLA, J. L.; GARDE, J. J. Comparison of the TBARS assay and BODIPY C11 probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. 360-368, 2009.

DONAVAN, A.; HANRAHAN, J. P.; KUMMEN, E.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. Fertility of the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronised oestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 359-368, 2004.

DORADO, J.; HIDALGO, M.; MUÑOZ, A.; RODRÍGUEZ, I. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. **Animal Reproduction Science**, v. 112, n. 1-2, p. 150-157, 2009.

DORADO, J.; MUÑOZ-SERRANO, A.; HIDALGO, M. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1-2, p. 115-123, 2010.

EKWALL, H.; HERNANDEZ, M.; SARAVIA, F.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of boar semen frozen in medium straws and Mini Flat Packs. **Theriogenology**, v. 67, p. 1463–1472, 2007.

FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W. Effects of changes in photoperiod on freezability of ram spermatozoa. **Cryobiology**, v. 20, n. 6, p. 684-689, 1983.

FLESCHE, F. M.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLDE, L. M. G.; GADELLA, B. M. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 262, p. 787-792, 1999.

GARNER, D. L. Hoechst 33342: the dye that enable the differentiation of living X- and Y-cromosome bearing mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 71, p. 11-21, 2009.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401–1406, 1997.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 481–487, 1997.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445–457, 2005.

GILLAN, L.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 447–454, 2004.

GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ-IZQUIERDO, E.; TOMÁS, C.; MOCÉ, E.; DE MERCADO, E. Is sperm freezability related to the post-thaw lipid peroxidation and the formation of reactive oxygen species in boars? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 2, p. 177-182, 2013.

GRINBERG, Y. Y.; DIBBERN, M. E.; LEVASSEUR, V. A.; KRAIG, R. P. Insulin-like growth factor-1 abrogates microglial oxidative stress and TNF- α responses to spreading depression. **Journal of Neurochemistry**, v. 126, n. 5, p. 662–672, 2013.

GRINBERG, Y. Y.; VAN DRONGELEN, W.; KRAIG, R. P. Insulin-like growth factor-1 lowers spreading depression susceptibility and reduces oxidative stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 122, n. 1, p. 221–9, 2012.

HAIDL, G.; OPPER, C. Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. **Human Reproduction**, v. 12, p. 2720–2723, 1997.

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

HARRISON, R. A.; ASHWORTH, P. J.; MILLER, N. G. Bicarbonate/co₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 378–391, 1996.

HARTWIG, F. P.; LISBOA, F. P.; HARTWIG, F. P.; MONTEIRO, G. A.; MAZIERO, R. R.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA, J. A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, v. 81 (2), p. 340-346, 2014.

HENNING, H.; PETRUNKINA, A.M.; HARRISON, R.A.P.; WABERSKI, D. Cluster analysis reveals a binary effect of storage on boar sperm motility function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 5, p. 623-632, 2014.

HERNANDEZ, M.; EKWALL, H.; ROCA, J.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of semen frozen in medium straws from good and sub-standard freezer AI-boars. **Cryobiology**, v. 54, p. 63–70, 2007.

HOLT, W.; MEDRANO, A. Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 52, p. 213–222, 1997.

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 91, p. 451–461, 1991.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.

HUSSAIN, S. A.; LESSARD, C.; ANZAR, M. A strategy for improvement of postthaw quality of bison sperm. **Theriogenology**, v. 79, n.1, p. 108-115, 2013.

ICKOWICZ, D.; FINKELSTEIN, M.; BREITBART, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. **Asian Journal of Andrology**, v. 14, p. 816-821, 2012.

JONES, R.; JAMES, P. S.; HOWES, L.; BRUCKBAUER, A.; KLENERMAN, D. Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. **Asian Journal of Andrology**.v. 9, p. 438-444, 2007.

KADIRVEL, G.; SATISH KUMAR; KUMARESAN, A.; KATHIRAVAN, P. Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. **Animal Reproduction Science**, v. 116, p. 244–253, 2009.

KATO, Y.; SHOEI, S.; NAGAO, Y. Capacitation status of activated bovine sperm cultured in media containing methyl- β -cyclodextrin affects the acrosome reaction and fertility. **Zygote**, v. 19, p. 21-30, 2011.

KOIVISTO, M. B.; COSTA, M. T.; PERRI, S. H.; VICENTE, W. R. The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls in the southeastern region of Brazil. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 4, p. 587-592, 2009.

KOPPERS, A. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; MCLAUGHLIN, E. A.; AITKEN, R. J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, p. 3199-3207, 2008.

KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; DU PLESSIS, S. S. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 425-435, 2010.

KUMAR, R.; SINGH, V. K.; ATREJA, S. K. Glutathione-S-transferase: Role in buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm capacitation and cryopreservation. **Theriogenology**, v. 81, p. 587-598, 2014.

KUMARESAN, A.; SIQUEIRA, A. P.; HOSSAIN, M. S.; BERGQVIST, A. S. Cryopreservation-induced alterations in protein tyrosine phosphorylation of spermatozoa from different portions of the boar ejaculate. **Cryobiology**, v. 63, p. 137-144, 2011.

LADBROOK, B.; CHAPMAN, D. Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes. A review and summary of some recent studies. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 3, p. 304, 1969.

LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 327-336, 2000.

LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 119-128, 2008.

LYMBEROPOULOS, A. G.; TSAKMAKIDIS, I. A.; KHALIFA, T. A. Effect of ram age on structural and functional competence of frozen-thawed spermatozoa in dairy sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 4, p. 572-578, 2010.

MAHFOUZ, R. Z.; DU PLESSIS, S. S.; AZIZ, N.; SHARMA, R.; SABANEH, E.; AGARWAL, A. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. **Fertility and Sterility**, v. 93, p. 814-821, 2010.

MAIA, M. M.; BICUDO, S. D.; SICHERLEB, C. C.; RODELLO, L.; GALLEGOS, I. C. S. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 118-123, 2010.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 121-133, 2004.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55–65, 1996.

MAZUR, P. Principles of cryobiology. **Life in the frozen state**. Boca Raton, FL, USA : CRC Press., 2004. p. 3–65.

MEDEIROS, C. M. O.; FORREL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.

MOCÉ, E.; PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 236–247, 2010a.

MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J. K. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 12, p. 57-66, 2010b.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 826–833, 2006.

MOCÉ, E.; TOMÁS, C.; BLANCH, E.; GRAHAM, J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on bull and goat sperm processed with fast or slow cryopreservation protocols. **Animal: An international journal of animal bioscience**. v. 8, p. 771-776, 2014.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v. 51, p. 241–249, 2005.

MORAES, C. N.; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, J. F. C.; SCHWEITZER, C. M. Criopreservação do sêmen ovino em pellets com etileno glycol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 2, p. 287-292, 1998.

MORRIS, G. J. Rapidly cooled human sperm: No evidence of intracellular ice formation **Human Reproduction**, v. 21, p. 2075–2083, 2006.

MORRIS, G. J.; FASZER, K.; GREEN, J. E.; DRAPER, D. E.; GROUT, B. W. W.; FONSECA, F. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. **Theriogenology**, v. 68, p. 804–812, 2007.

MOTAMEDI-MOJDEHI, R.; ROOSTAEI-ALI MEHR, M.; RAJABI-TOUSTANI, R. Effect of different levels of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on cryosurvival of ram spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 1, p. 65-70, 2013.

MÜLLER, K.; MÜLLER, P.; PINCEMY, G.; KURZ, A.; LABBE, C. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 390–399, 2008.

MURPHY, C.; ENGLISH, A. M.; HOLDEN, S. A.; FAIR, S. Cholesterol-loaded-cyclodextrins improve the post-thaw quality of stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 145, p. 123-129, 2014.

NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E. K.; GADELLA, B. M. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1828–1835, 2003.

NAVRATIL, A. M.; BLISS, S. P.; BERGHORN, K. A.; HAUGHIAN, J. M.; FARMERIE, T. A.; GRAHAM, J. K.; CLAY, C. M.; ROBERSON, M. S. Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 31593–31602, 2003.

NIKOLOPOULOU, M.; SOUCEK, D. A.; VARY, J. C. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 815, p. 486–498, 1985.

NISHIJIMA, K.; YAMAGUCHI, S.; TANAKA, M.; SAKAI, Y.; KOSHIMOTO, C.; MORIMOTO, M.; WATANABE, T.; FAN, J.; KITAJIMA, S. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the rate and the quality of motility in frozen and thawed rabbit sperm. **Experimental Animals**, v. 63, p. 149–154, 2014.

OLIVEIRA, B. M. M.; ARRUDA, R. P.; THOMÉ, H. E.; MATURANA FILHO, M.; OLIVEIRA, G.; GUIMARÃES, C.; NICHI, M.; SILVA, L. A.; CELEGHINI, E. C. C. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescence probes. **Theriogenology**, v. 82, p. 767–772, 2014.

OLIVEIRA, C. H.; VASCONCELOS, A. B.; SOUZA, F. A.; MARTINS-FILHO, A. O.; SILVA, M. X.; VARAGO, F. C.; LAGARES M. A. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 194–200, 2010.

OLSON, S. D.; SUAREZ, S. S.; FAUCI, L. J. Coupling biochemistry and hydrodynamics captures hyperactivated sperm motility in a simple flagellar model. **Journal of Theoretical Biology**, v. 283, p. 203–216, 2011.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GARCÍA, B. M.; GALLARDO-BOLAÑOS, J. M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 393–403, 2009a.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MORRELL, J. M.; SALAZAR-SANDOVAL, C.; MACÍAS-GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v. 138, p. 55–63, 2009b.

OSHEROFF, J. E.; VISCONTI, P. E.; TRAVIS, A. J.; ALVAREZ, J.; KOPF, G. S. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, p. 1017–1026, 1999.

PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 653–668, 1985.

PEÑA, F. J.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J. A.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MACÍAS GARCÍA, B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 345–349, 2009.

PETRUNKINA, A. M.; GRÖPPER, B.; TÖPFER-PETERSEN, E.; GÜNZEL-APEL, A-R. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. **Theriogenology**, v. 63, p. 1390-1406, 2005.

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

PINHEIRO, C. B. M. **Uso do sêmen ovino congelado em inseminações artificiais cervicais e fatores que afetam a fertilidade dos rebanhos**. 2009. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

POTTER, J. E. R.; MILLETTE, C. F.; JAMES, M. J.; KANDUTSCH, A. A. Elevated cholesterol and dolichol synthesis in mouse pachytene spermatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 7150–7154, 1981.

PURDY P. H.; GRAHAM J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v. 48, p. 36–45, 2004.

PURDY, P. H.; MOCE, E.; STOBART, R.; MURDOCH, W.; J.; MOSS, G.; E.; LARSON, B.; RAMSEY, S.; GRAHAM, J.; K.; BLACKBURN, H. D. The fertility of ram sperm held for 24h at 5°C degrees prior to cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 231–235, 2010.

RANA, A. P.; MAJUMDER, G. C.; MISRA, S.; GHOSH, A. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1061, p. 185–196, 1991.

RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrossomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.

RAPATZ, G. L.; MENZ, L. J.; LUYET, B. J.; MERYMAN, H. T. (Ed.). **Freezing process in biological materials**. London : Academic Press, 1966. p. 147–148.

REJRAJI, H.; SION, B.; PRENSIER, G.; CARRERAS, M.; MOTTA, C.; FRENOUX, J. M.; VERICEL, E.; GRIZARD, G.; VERNET, P.; DREVET, J. R. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 1104–1113, 2006.

RIVLIN, J.; MENDEL, J.; RUBINSTEIN, S.; ETKOVITZ, N.; BREITBART, H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 518-522, 2004.

ROVEGNO, M.; FEITOSA, W. B.; ROCHA, A. M.; MENDES, C. M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. Assessment of post-thawed ram sperm viability after incubation with seminal plasma. **Cell Tissue Bank**, v. 14, p. 333–339, 2013.

SAEZ, F.; OUVRIER, A.; DREVET, J. R. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 11–17, 2011.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77–111, 2000.

SANCHEZ, S. A.; GUNTHER, G.; TRICERRI, M. A.; GRATTON, E. Methyl- β -cyclodextrins preferentially remove cholesterol from the liquid disordered phase in giant unilamellar vesicles. **Journal of Membrane Biology**, v. 241, p. 1–10, 2011.

SCHULZE, M.; HENNING, H.; RÜDIGER, K.; WALLNER, U.; WABERSKI, D. Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. **Theriogenology**, v. 80, n. 9, p. 990–998, 2013.

SHERMAN, J. K.; LIU, K. C. Ultrastructure before freezing, while frozen, and after thawing in assessing cryoinjury of mouse epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v. 19, p. 503–510, 1988.

SPIZZIRI, B. E.; FOX, M. H.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 255–264, 2010.

STROMSTEDT, M.; WATERMAN, M. R.; HAUGEN, T. B.; TASKEN, K.; PARVINEN, M.; ROZMAN, D. Elevated expression of lanosterol 14 α -demethylase (CYP51) and the synthesis of oocyte meiosis-activating sterols in postmeiotic germ cells of male rats. **Endocrinology**, v. 139, p. 3771–3771, 1998.

SUAREZ, S. S. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 52, p. 455–462, 2008.

TAN, C. M.; XENOYANNIS, S.; FELDMAN, R. D. Oxidant stress enhances adenylyl cyclase activation. **Circulation Research**, v. 77, p. 710–717, 1995.

TAO, J.; CRITSER, E.; CRITSER, J. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. **Molecular Reproduction and Development**, v. 36, p. 183–194, 1993.

TERUYA, J. H.; SALIDO, E. C.; EDWARDS, P. A.; CLARKE, C. F. Testis-specific transcripts of rat farnesyl pyrophosphate synthetase are developmentally regulated and localized to haploid germ cells. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 663–671, 1991.

TOMÁS, C.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ-IZQUIERDO, E.; MOCÉ, E.; DE MERCADO, E. Addition of cholesterol-loaded cyclodextrins to the thawing extender: effects on boar sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 3, p. 427–432, 2014.

- VADNAIS, M. L.; KIRKWOOD, R.; SPRECHER, D.; CHOU, K. Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. **Animal Reproduction Science**, v. 90, p. 347–354, 2005.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted sêmen analysers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v 57, p. 149-179, 2002.
- VISCONTI, P. E.; BAILEY, J. L.; MOORE, G. D.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P.; KOPF, G. S. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. **Development**, v. 121, p. 1129–1137, 1995a.
- VISCONTI, P. E.; GALANTINO-HOMER, H.; NING, X.; MOORE, G. D.; VALENZUELA, J. P.; JORGEZ, C. J.; ALVAREZ, J. G.; KOPF, G. S. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. Beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 3235–3242, 1999.
- VISCONTI, P. E.; MOORE, G. D.; BAILEY, J. L.; LECLERC, P.; CONNORS, S. A.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P.; KOPF, G. S. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. **Development**, v. 121, p. 1139–1150, 1995b.
- WATANABE, H.; KONDOH, G. Mouse sperm undergo GPI-anchored protein release associated with lipid raft reorganization and acrosome reaction to acquire fertility. **Journal of Cell Science**, v. 124, p. 2573–2581, 2011.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.
- WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: CLARKE, A. (Ed.). **Effects of low temperatures on biological membranes**. London : Academic Press, 1981. p. 189–218.
- WECHSLER, A.; BRAFMAN, A.; SHAFIR, M.; HEVERIN, M.; GOTTLIEB, H.; DAMARI, G.; GOZLAN-KELNER, S.; SPIVAK, I.; MOSHKIN, O.; FRIDMAN, E.; BECKER, Y.; SKALITER, R.; EINAT, P.; FAERMAN, A.; BJÖRKHEM, I.; FEINSTEIN, E. Generation of viable cholesterol-free mice. **Science**, v. 302, p. 2087, 2003.
- WENNEMUTH, G.; CARLSON, A. E.; HARPER, A. J.; BABCOCK, D. F. Bicarbonate actions on flagellar and Ca^{2+} -channel responses: initial events in sperm activation. **Development**, v. 130, p. 1317–1326, 2003.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p. 189–317.
- YANCEY, P. G.; RODRIGUEZA, W. V.; KILSDONK, E. P. C.; STOUT, G. W.; JOHNSON, W. J.; PHILLIPS, M. C.; ROTHBLAT, G. H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 16026–16034, 1996.

ZAFFALON, F. G. **Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja.** 2009. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ZAHALSKY, M. P.; ZOLTAN, E.; MEDLEY, N.; NAGLER, H. M. Morphology and the sperm penetration assay. **Fertility and Sterility**, v. 79, n 1, 2003.

ZHANG, H.; ZHENG, R-L. Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion. **Free Radical Research**, v. 24, p. 261-268, 1996.

ZENG, W. X.; TERADA, T. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 111–118, 2001.

ZERVOS, I. A.; TSANTARLIOTOU, M. P.; VATZIAS, G.; GOULAS, P.; KOKOLIS, N. A.; TAITZOGLU, I. A. Effects of dietary vitamin A intake on acrosin- and plasminogen-activator activity of ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 129, n. 6, p. 707–715, 2005.

ANEXO A

TALP SPERM (Bavister et al., 1983)

1.Solução de sais de TALP (para preparar 500mL)

Componentes:

Componentes	Quantidade (g) para preparar 500mL
NaCl.....	2,1g
KCl.....	0,935g
NaHCO ₃	1,05g
NaH ₂ PO ₄	0,025g
CaCl ₂ H ₂ O.....	0,145g
MgCl 6H ₂ O.....	0,04g
Hepes.....	3,25g

Preparo:

- Diluir CaCl₂ 2H₂O e MgCl 6H₂O em 200mL de água Milli-Q;
- Os demais sais devem ser diluídos em 200mL de água Milli-Q;
- Combinar as duas soluções e completar para 500ml;
- Filtrar;
- Manter resfriado.

2.Solução dos metabólitos glicosados

A. Solução estoque (para preparar 500mL)

Componentes:

Componentes	Quantidade (g) para preparar 500mL
Glicose.....	2,5g

Lactato de sódio.....	9,25mL
Piruvato de sódio.....	70mg
Pen-Strep.....	12,5mL

Preparo:

- Dissolver todos os componentes;
- Aliquotar (alíquotas de 5mL);
- Manter em freezer (-20°C).

B. Solução trabalho

- Pipetar 45mL da solução de sais de TALP;
- Ajustar pH para 7,4;
- Adicionar 5mL da solução estoque de metabólitos glicosados;
- Filtrar em filtro de 0,45µm;
- Aliquotar (alíquotas de 300µL);
- Manter em freezer (-20°C).

3.Preparo no dia

Componentes:

Componente	Quantidade
Solução de sais de TALP	10mL
Solução trabalho de metabólitos glicosados	200µL
Albumina sérica bovina (BSA).....	100mg

Preparo:

- Dissolver BSA e incubar por 10min;
- Ajustar o pH para 7,4;
- Filtrar em filtro de 0,45µm.

ANEXO B

FORMOL SALINO 4%

Componentes:

Componentes	Quantidade para fazer 1000mL
Formol 37%	40mL
.....	
DPBS/Solução salina	960mL
.....	

ANEXO C

PREPARO DAS SONDAS FLUOROSCENTES**HOESCHT 33342**

Molecular Probes

Solução estoque (25 mg/ml)

- Diluir o Hoescht 100mg em 4mL de DMSO para ficar na concentração de 25mg/mL (solução estoque);
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20°C.

Solução de trabalho (0,5mg/ml)

- Adicionar a 980µl de DPBS, 20µl de H3342 (solução estoque, 25mg/ml) para ficar a concentração de 0,5mg/mL (solução trabalho);
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20°C.

IODETO DE PROPÍDEO (PI)

Propidium iodate, 28,707-5- 25mg, Sigma-Aldrich

Solução estoque 25mg/mL

- Adicionar 1mL de DMSO à 25mg de PI;
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20°C.

Solução trabalho 0,5mg/mL

- Adicionar 20µL de PI (solução estoque, 25mg/mL) a 980µL de PBS;

- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20°C.

FITC-PSA

Lectina obtida de *Pisum sativum*, L0770, Sigma-Aldrich

Solução de trabalho (100µg/ml)

- No frasco do FITC-PSA acrescentar 1 ml de DPBS e homogeneizar;
- Em tubo falcon coberto com papel alumínio adicionar 18mL de DPBS, 1mL de solução de azida de sódio 1% e 1mL da solução do FITC-PSA homogeneizada;
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20°C.

SOLUÇÃO ESTOQUE AZIDA DE SÓDIO 1%

- Adicionar 0,2g de azida de sódio (Sigma- Aldrich, S8032) a 20mL de DPBS.

JC-1

T3168- 5mg, Molecular Probes

Solução estoque 1 mg/ml (153mM)

- Adicionar 5mL de DMSO a 5mg de JC-1 ficando na concentração de 153mM.

Solução de trabalho(153 µM)

- Adicionar 1mL de JC-1 153mM (solução estoque) a 9mL de DMSO para ficar na concentração de 153µM;
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20°C.

CellROX[®]

CellROX Deep Red[®] 2,5mM, Invitrogen

Solução de trabalho (1mM)

- Adicionar 8µL de CellROX[®] 2,5mM a 12µL de DMSO;
- Armazenar a -20°C.

ANEXO D

SETUP SISTEMA CASA (programa SCA - Sperm Class Analyser; MICROPTIC, Barcelona, Espanha)

Característica	Ajuste
Número de imagens adquiridas.....	25
Taxa de aquisição de imagens (por segundo).....	24
Tamanho mínimo da célula.....	3 μm^2
Valor de corte de VCL para células rápidas	> 75 $\mu\text{m/s}$
Valor de corte de VCL para células lentas.....	< 45 $\mu\text{m/s}$
Retilinearidade (STR), Limiar.....	> 80%
Movimento circular (LIN).....	< 50%
Temperatura.....	37°C