ENEIVA CARLA CARVALHO CELEGHINI

*Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática,
acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando
sondas fluorescentes*

ENEIVA CARLA CARVALHO CELEGHINI

*Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática,
acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides
utilizando sondas fluorescentes*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de Concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

São Paulo
2005

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1500 FMVZ	<p>Celeghini, Eneiva Carla Carvalho</p> <p>Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes / Eneiva Carla Carvalho Celeghini. – São Paulo : E. C. C. Celeghini, 2005.</p> <p>186 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2005.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal. Área de concentração: Reprodução Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.</p> <p>1. Bovinos. 2. Espermatozoides. 3. Criopreservação. 4. Sondas fluorescentes. 5. Mitocôndrias. I. Título.</p>
----------------	---

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos da criopreservação do sêmen bovino quanto à motilidade, viabilidade espermática, integridade acrossômica e função mitocondrial determinados por citometria de fluxo", Protocolo nº 127/2002, sob a responsabilidade do Prof.Dr. Rubens Paes de Arruda, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão de 05/06/2002.

(We certify that the Research "Evaluation of the effects of bovine sperm cryopreservation on motility, sperm viability, acrosomal integrity and mitochondrial function assessed by flow cytometry" protocol number 127/2002, under the responsibility of Prof.Dr. Rubens Paes de Arruda, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 06/05/2002 meeting.

São Paulo, 05 de junho de 2002

Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do Autor: CELEGHINI, Eneiva Carla Carvalho Celeghini

Título: Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Senhor,

*Dê-me paciência para aceitar as
coisas que não posso mudar.*

*Dê-me coragem para mudar
aquelas que posso.*

*E dê-me discernimento para
distingüí-las.*

Ao meu pai, *Eraldo Antônio
Celeghini* (in memoriam), cujos
ensinamentos estão sempre
presentes na minha vida.
“Seguir sempre o caminho
correto, por mais difícil que
pareça”.

À minha mãe, *Zenaide José de Carvalho
Celeghini*, com seu comportamento
altruísta, nunca esmoreceu e sempre
esteve presente em todos os sentidos,
dando-nos amor e incentivo, sem medir
esforços para que possamos alcançar
nossos ideais.

À minha irmã, *Eneida Carvalho
Celeghini*, e meus sobrinhos,
Eneidinha e *Eduardo*, que o amor
que tenho por eles serviu de
incentivo para continuar buscando o
melhor caminho.

DEDICO, com muito amor e carinho!

Ao meu orientador e amigo *Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda*. Minha admiração pelo profissional de tão elevada capacidade, a quem devo a oportunidade de grandes ensinamentos na reprodução animal e o aguçamento para a pesquisa científica. Minha gratidão pela acolhida no Departamento de Reprodução Animal, desta instituição, e por fornecer subsídios para meu desenvolvimento profissional. Meu respeito, pelo ser humano grandioso.

“O estudo da gramática não faz poetas. O estudo da harmonia não faz compositores. O estudo da psicologia não faz pessoas equilibradas. O estudo das “ciências da educação” não faz educadores. Educadores não podem ser produzidos. Educadores nascem. O que se pode fazer é ajuda-los a nascer. Pela educação o indivíduo se torna mais apto a viver, aprende a pensar e a resolver os problemas práticos da vida. Pela educação ele se torna mais sensível e mais rico interiormente, o que faz dele uma pessoa mais bonita, mais feliz e mais capaz de conviver com os outros. A maioria dos problemas da sociedade se resolveria se os indivíduos tivessem aprendido a pensar”.

Rubem Alves

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabé*, pelo exemplo de dedicação à Reprodução Animal e pelo paternalismo com que zela por seus alunos.

À *Profa. Dra. Valquíria Hyppólito Barnabe*, pelo incentivo na andrologia animal e inestimáveis sugestões por ocasião do exame de qualificação.

Ao *Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira*, chefe da pós-graduação do Departamento de Reprodução Animal, pela oportunidade de integrar a pós-graduação.

Ao *Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli*, pela dedicação ao Departamento de Reprodução Animal.

Ao *Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles*, pelo apoio durante a execução experimental e disponibilidade do laboratório para realização das análises preliminares.

À *Giovana Krempel Fonseca Meringhe*, pelo constante apoio durante o desenvolvimento das análises no LMMD.

Ao *Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia*, por ceder-nos gentilmente a sonda fluorescente MitoTracker, com a qual iniciamos as análises preliminares de nossos estudos.

Ao *Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues*, pela orientação e execução da análise estatística.

À *Profa. Dra. Lia de Alencar Coelho*, pelas valiosas sugestões realizadas no exame de qualificação e pelo convívio no Campus de Pirassununga.

Ao *Prof. Dr. Frederico Osanam Papa*, pelo gentil fornecimento do diluidor utilizado no experimento e sugestões.

Aos *Profs. Drs. Ed Hoffman Madureira, Mario Binelli e Anneliese de Souza Traldi*, professores de tão grande capacidade com os quais tive o privilégio de conviver durante muitos anos.

Ao *Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque*, ser humano de grande valor, em quem procuro me espelhar, pelo grande apoio desde o mestrado.

Ao *Prof. Dr. Wilson Gonçalves Viana*, a quem serei eternamente grata por me acolher num momento difícil.

Ao *Prof. Dr. José Antonio Visintin*, pelo apoio e amizade.

À *Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção*, pela amizade.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal, que contribuem constantemente para o crescimento da ciência.

Ao querido *Carlos Valmorbida*, pelo apoio e incentivo constantes.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologias do Sêmen e Andrologia (LBSA) *Juliana Nascimento, André Furugem Cesar de Andrade e Cláudia Fernandes Raphael*, pelo grande auxílio durante o desenvolvimento experimental e acima disso: *Por Vocês Existirem!!!*

À minha grande amiga, *Norma Lúcia de Souza*, por tantos momentos compartilhados, especialmente nas fases árduas deste trabalho. À pequena *Maria Heloísa*, pelos momentos encantados na sua presença.

Aos estagiários que passaram pelo LBSA e que, sem exceção, deixaram sua contribuição profissional e um laço de amizade de valor imensurável *Fernandão, Guilherme, Eduardo, Rodrigo, André, Vivian, Daniel, Sandra, Lucas, Gustavo, Claudinei, Fernanda, Juliana, Thaís, Rodrigo, Neto e muitos outros*.

Aos meus amigos de pós-graduação do LBSA *Luiz Waldemar de Oliveira Souza, Rodrigo Alonso Forero Gonzalez e Alexandre Rossetto Garcia*, pela oportunidade de convívio durante o desenvolvimento deste curso.

Às amigas *Claudia Maria Bertan, Maria Fernanda Pereira Loureiro, Adriana Capezzuto, Graziela de Almeida Portella, Ana Rita, Patrícia Miguez, Pauline Martins da Cunha e Vanessa Marques*, cujo convívio proporcionou momentos de alegria, mas também de aprendizado para o crescimento pessoal.

Aos amigos do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal pós-graduandos *Alexandre Barreto, José Rodrigo Valim Pimentel, Pércio Gaspar, Luis Augusto Rossa, André Fernando Freire, Wagner Loesh Viana, Marcelo Cardoso, Luis Augusto Castro e Paula, João Gustavo Pereira Loureiro*, ainda aos estagiários *Priscila, Ângelo (Cokret), Marcelo (Febem), Fabiana (Martini), Jamile, Gisele (Loló), Flávia, David (Entulho) e Bruna (T.D.)*.

Ao *André Luis Granito*, grande amigo e profissional admirável.

Ao *Marcelo Rezende Luz*, pela amizade e tanto incentivo.

Aos queridos *Nélcio Antônio Tonizza de Carvalho*, *Manoel Sá*, *Ana Karina Cavalcanti*, *Cláudio* (Speto), *Simone*, *Francine*, pelo companheirismo.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, com os quais o convívio foi sempre agradável, com os quais os laços de amizade são fortes e verdadeiros *Creusa Catice Pagotti*, *Isabel Barbosa*, *Márcio De Carli*, *José Maria Bernardi* e *André* (Zanquetinha).

À *Harumi D Shiraishi*, pela presteza de sempre.

À *Elza Faquim*, por sua atenção e disposição em auxiliar na padronização da tese.

Ao *José Carlos Laranjeiras Betinarde*, simplesmente por sua existência!

Ao *Departamento de Reprodução Animal* da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial ao *Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal*, minha segunda casa.

À *IMV Technologies*, *IVP do Brasil*, pelo fornecimento do diluidor utilizado neste experimento.

À *FAPESP*, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro, por meio da concessão da bolsa de estudo, processo número 00/14653-6.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho e que, injustamente, me falha no momento a lembrança.

RESUMO

CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes. [Effects of bovine semen cryopreservation on sperm plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes and chromatin structure using fluorescent probes]. 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

A criopreservação, como já conhecido, causa danos da função celular podendo, com isso, apresentar redução da fertilidade. O desenvolvimento de técnicas para avaliar a viabilidade espermática, que visam aperfeiçoar o processo de avaliação seminal tem sido meta de muitas pesquisas. Este trabalho foi dividido em dois experimentos. O experimento 1 foi realizado para o desenvolvimento e validação de técnicas práticas e de alta repetibilidade para a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial de espermatozóides bovinos pela associação de sondas fluorescentes. O experimento 2 foi realizado para avaliar os efeitos que a criopreservação pode causar sobre a motilidade espermática, membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (pela técnica desenvolvida no experimento 1) e estrutura da cromatina de espermatozóides bovinos frente a dois diluidores diferentes, bem como verificar a existência de correlações entre alterações nas membranas e características de motilidade em espermatozóides bovinos criopreservados. No experimento 1 as associações das sondas iodeto de propídio (PI, para avaliar integridade da membrana plasmática) e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, para avaliar a integridade acrossomal), foram divididas em quatro protocolos, nos quais foram testadas diferentes sondas para avaliar a função mitocondrial. Rodamina 123 (R123, protocolo 1), MitoTracker Green FM (MITO, protocolo 2), CMXRos ou MitoTracker red (protocolo 3) e no: iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1, protocolo 4). Estes protocolos foram testados e validados. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, teste de *Fisher* e à análise de regressão linear pelo programa Stat-View® (SAS Institute, Inc. 1998). O protocolo 1 não apresentou resultados satisfatórios, não sendo possível validar, enquanto, os protocolos 2, 3 e 4 foram validados e apresentaram resultados bastante consistentes. O protocolo 4 foi

escolhido para a utilização no experimento 2. Para o experimento 2 foram realizadas sete colheitas de sêmen de oito touros puros da raça Simental. Após a colheita, o sêmen foi avaliado quanto ao volume, concentração, motilidade e vigor visualmente, motilidade por sistema computadorizado (CASA), características morfológicas por microscopia de interferência diferencial, integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial, pela associação de FITC-PSA, PI e JC-1, e integridade da estrutura da cromatina, pela técnica da acridina laranja. Após as análises, o sêmen foi dividido em duas alíquotas, sendo uma das alíquotas diluída com o diluidor Bioxcell[®] e a outra com o diluidor Botu-Bov[®], envasado em palhetas e submetido a congelação com um sistema automatizado. Duas palhetas cada tratamento foram descongeladas e o sêmen foi avaliado quanto a motilidade e vigor visualmente, motilidade pelo CASA, características morfológicas, integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial e estrutura da cromatina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985), os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey. Foram calculadas correlações lineares de Pearson. O nível de significância foi fixado em 5%. Foram observados efeitos da criopreservação e do diluidor sobre motilidade e vigor visual, motilidade pelo CASA, características morfológicas, integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial. De forma que, após a criopreservação houve aumento dos danos nas estruturas espermática e o diluidor Botu-Bov[®] apresentou a maioria das características melhores quando comparado ao diluidor Bioxcell[®].

Palavras-chave: Bovinos. Espermatozóides. Criopreservação. Sondas fluorescentes. Mitocôndrias.

ABSTRACT

CELEGHINI, E. C. C. Effects of bovine semen cryopreservation on sperm plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes and chromatin structure using fluorescent probes. [Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes]. 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The process of cryopreservation causes damages in the sperm cellular function which may lead to a reduction in fertility. New techniques to evaluate sperm viability may improve the process of semen evaluation. The present work was divided in two experiments. Experiment 1 aimed the development and validation of practical techniques with high repetibility for simultaneous evaluation of integrity of plasmatic and acrosomal membrane and mitochondrial function of bovine spermatozoa by the strategic association of fluorescent probes. Objective of experiment 2 was to validate the effects of cryopreservation using two different diluents on sperm motility, plasmatic, acrosomal, mitochondrial membranes integrity and chromatin structure of bovine spermatozoa. A second objective was to verify the correlations between alterations in membranes and motility characteristics in cryopreserved bovine spermatozoa. In experiment 1 propidium iodide (PI, to evaluate plasmatic membrane integrity) and the *Pisum sativum* agglutinin conjugated with fluorescein isothiocyanate- (FITC-PSA, to evaluate acrosomal integrity). Probes were associated to evaluate mitochondrial function in four protocols: Rhodamine 123 (R123, Protocol 1), MitoTracker Green FM (MITO, protocol 2), CMXRos or MitoTracker red (protocol 3), and 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1, protocol 4). Results were submitted to analysis of variance, *Fisher's* test and linear regression analysis by the program Stat-View[®] (SAS Institute, Inc.1998). It was not possible to validate protocol 1, while the protocols 2, 3 and 4 were validated and showed consistent results. Protocol 4 was used in experiment 2. For experiment 2 seven ejaculates were collected from eight Simental bulls. Volume, concentration, motility and vigour of semen were evaluated subjectively, motility by computer system (CASA), morphological characteristics by differential interference microscopy, plasmatic and acrosomal membranes integrity and, mitochondrial function with FITC-PSA, PI and JC-1 association, and chromatin integrity by acridine orange technique.

Then, semen was divided in two aliquots. One was diluted with Bioxcell[®] and the other with Botu-Bov[®] diluent, packaged in 0.5 mL straws and frozen using an automated system. Two straws of semen from each treatment were thawed and the semen parameter evaluated, as described above. The statistical analysis was performed using the Statistical Analysis System program (SAS Institute Inc., 1985). Data were submitted to analysis of variance and Tukey's test. Pearson's linear correlations were calculated. Cryopreservation increased damages in spermatid structures. Botu-Bov[®] diluent was better in preserve the motility and membrane integrity ($P < 0,05$) when compared to Bioxcell[®] diluent.

Key-words: Bovine. Spermatozoa. Cryopreservation. Fluorescent probes. Mitochondria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Touros da raça Simental utilizados para a experimentação – Pirassununga - 2005.....	72
Figura 2 - Esquema para o preparo do sêmen em três tratamentos, de acordo com a proporção de Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> (T100, T50 e T0) - Pirassununga - 2002.....	77
Figura 3 - Esquema simplificado dos procedimentos realizados no experimento 2 - Pirassununga -2005.....	81
Figura 4 - Sistema programável para criopreservação de sêmen (Tetakon, TK-3000). 1. aparelho programável, 2. Tubo de resfriamento adaptado com porta-palhetas e 3. Caixa térmica para nitrogênio líquido - Pirassununga - 2005.....	88
Figura 5 - Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e MITO (aumento 1.000 x). A. Células com membrana plasmática intacta e acrossomo intacto, uma sem função mitocondrial (superior) e outra com função mitocondrial (inferior). B. Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado, com função mitocondrial. C. Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado, sem função mitocondrial. D. Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, sem função mitocondrial. E. Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, com função mitocondrial. F. Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, sem função mitocondrial - Pirassununga –2002 .	95
Figura 6 - Integridade de membrana plasmática, verificada pela exclusão do iodeto de propídio no protocolo PI/FITC-PSA/MITO, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 100:0) - Pirassununga –2002	98
Figura 7 - Acrossomo íntegro, detectada pelo FITC-PSA no protocolo PI/FITC-PSA/MITO, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 100:0) - Pirassununga –2002	99

- Figura 8 - Função mitocondrial, verificada pelo MitoTracker Green FM, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0) – Pirassununga –2002 100
- Figura 9 - Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI, H342, FITC-PSA e CMXRos (aumento 1.000 x). **A.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto, com função mitocondrial. **B.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto, sem função mitocondrial. **C.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado, sem função mitocondrial. **D.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, sem função mitocondrial. **E.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, com função mitocondrial. **F.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, sem função mitocondrial – Pirassununga –2004 102
- Figura 10 - Integridade de membrana plasmática, no protocolo PI/H342/FITC-PSA/CMXRos, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0) - Pirassununga –2004 105
- Figura 11 - Acrossomo íntegro, no protocolo PI/H342/FITC-PSA/CMXRos, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0) – Pirassununga –2004 106
- Figura 12 - Função mitocondrial, verificada pelo CMXRos no protocolo PI/H342/FITC-PSA/CMXRos, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0) – Pirassununga –2004..... 107
- Figura 13 - Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI, H342, FITC-PSA e JC-1 (aumento 1.000 x). **A.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto, com alto potencial de membrana mitocondrial. **B.** Superior = célula com membrana plasmática lesada (núcleo vermelho), acrossomo intacto, com baixo potencial de membrana mitocondrial, Inferior = célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto, com baixo potencial de membrana mitocondrial. **C.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado, com alto potencial de membrana mitocondrial. **D.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado, com baixo potencial de membrana mitocondrial. **E.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, com baixo potencial de membrana mitocondrial. **F.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, com baixo potencial de membrana mitocondrial..... 109

Figura 14 - Integridade de membrana plasmática, no protocolo PI/H342/FITC-PSA/JC-1, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 100:0) – Pirassununga –2004	112
Figura 15 - Acrossomo íntegro no protocolo PI/H342/FITC-PSA/JC-1, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 100:0) - Pirassununga –2004	113
Figura 16 - Função mitocondrial, verificada pelo JC-1 no protocolo PI/H342/FITC-PSA/JC-1, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a <i>flash frozen</i> , 100:0) - Pirassununga –2004	114
Figura 17 - Motilidade espermática (média $\pm$ erro padrão da média) estimada visualmente no sêmen bovino fresco e criopreservado com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] - Pirassununga –2005	116
Figura 18 - Vigor espermático (média $\pm$ erro padrão da média) estimado visualmente no sêmen bovino fresco e criopreservado com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] - Pirassununga - 2005	117
Figura 19 - Motilidade Total e Progressiva (média $\pm$ erro padrão da média) estimadas pelo sistema computadorizado de análise para sêmen bovino fresco e criopreservado com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] - Pirassununga – 2005	118
Figura 20 - Velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) (médias $\pm$ erros padrão da média) estimadas por sistema computadorizado para sêmen bovino fresco e criopreservado com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] - Pirassununga –2005	119
Figura 21 - Deslocamento lateral da cabeça (média $\pm$ erro padrão da média) estimado por sistema computadorizado para sêmen bovino fresco e criopreservado com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] - Pirassununga –2005	120
Figura 22 - Frequência de batimento (média $\pm$ erro padrão da média) estimada por sistema computadorizado para sêmen bovino fresco e criopreservado com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] - Pirassununga –2005	121
Figura 23 - Retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) (média $\pm$ erro padrão da média) estimadas por sistema computadorizado para sêmen bovino fresco e criopreservado com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] - Pirassununga – 2005	122

Figura 24 - Alterações morfológicas (média $\pm$ erro padrão da média) de espermatozóides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] - Pirassununga –2005	124
Figura 25 - Porcentagem (média $\pm$ erro padrão da média) de espermatozóides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] com membrana plasmática intacta (MPI), acrossomo intacto (AI) e com função mitocondrial (CFM) - Pirassununga –2005	125
Figura 26 - Média erro $\pm$ padrão da média da porcentagem de espermatozóides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] contendo membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e função mitocondrial (PIAIC) - Pirassununga –2005	126
Figura 27 - Porcentagem (média $\pm$ erro padrão da média) de espermatozóides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] contendo membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e sem função mitocondrial (PIAIS) - Pirassununga –2005	127
Figura 28 - Porcentagem (média $\pm$ erro padrão da média) de espermatozóides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] contendo membrana plasmática intacta, acrossomo intacto com (PIALC) e sem função mitocondrial (PIALS) - Pirassununga –2005	128
Figura 29 - Porcentagem (média $\pm$ erro padrão da média) de espermatozóides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] contendo membrana plasmática lesada, acrossomo intacto (PLAIC) e lesado (PLALC) com função mitocondrial - Pirassununga –2005	129
Figura 30 - Porcentagem (média $\pm$ erro padrão da média) de espermatozóides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] contendo membrana plasmática lesada, acrossomo intacto (PLAIS) e lesado (PLALS) sem função mitocondrial - Pirassununga –2005	130
Figura 31 - Porcentagem de cromatina desnaturada (média $\pm$ erro padrão da média) de espermatozóides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell [®] e Botu-Bov [®] - Pirassununga –2005	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quadro de Análise de Variância para delineamento em blocos com 3 tratamentos - Pirassununga – 2005	91
Tabela 2 - Médias $\pm$ desvios padrão (%) de integridade da membrana plasmática, integridade do acrossomo e função mitocondrial obtidas no protocolo PI/FITC-PSA/MITO entre os tratamentos T0, T50 e T100 - Pirassununga – 2002	97
Tabela 3 - Médias $\pm$ desvios padrão (%) de integridade da membrana plasmática, integridade do acrossomo e função mitocondrial obtidos do protocolo PI/H342/FITC-PSA/CMXRos entre os tratamentos T0, T50 e T100 - Pirassununga –2004	104
Tabela 4 - Médias $\pm$ desvios padrão (%) de integridade da membrana plasmática, integridade do acrossomo e função mitocondrial obtidos do protocolo PI/H342/FITC-PSA/JC-1 entre os tratamentos T0, T50 e T100 - Pirassununga –2004	111
Tabela 5 - Médias $\pm$ erros padrão da média do volume seminal e concentração espermática do sêmen <i>in natura</i> dos diferentes touros em sete colheitas de sêmen - Pirassununga –2005	115
Tabela 6 - Correlações entre as características de membrana e a avaliação da motilidade espermática avaliadas visualmente e por sistema computadorizado (CASA) - Pirassununga –2005	132

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das células em categorias de acordo com a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial, detectadas pelas sondas PI, FITC-PSA e JC-1, respectivamente, Pirassununga – 2005..	85
Quadro 2 - Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de PI, FITC-PSA e MITO - Pirassununga –2002	94
Quadro 3 - Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de PI, H342, FITC-PSA e CMXRos - Pirassununga –2004	101
Quadro 4 - Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de PI, H342, FITC-PSA e JC-1 - Pirassununga –2004	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	alfa
β	beta
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
μm	micrômetro
ADP	adenosinadifosfato
ALH	amplitude lateral da cabeça
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosinatrifosfato
BCF	frequência de batimentos
BSA	albumina sérica bovina
CASA	Computer-Assisted Semen Analysis – Análise Computadorizada do Sêmen
CFDA	diacetato de carboxifluoresceína
CMXRos	cloreto de 8-(4'-clorometil) fenil-2,3,5,6,11,12,14,15 octahidro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino-8H-xantílio (MitoTracker red [®])
ConA	concanavalina A (<i>Concanavalina ensiformis</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPBS / PBS	solução tamponada salina de Dulbecco
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FITC-PSA	glutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada a isotiocianato de fluoresceína
g	grama
g	gravidade
H258	Hoechst 33258
H ₂ -CMXRos	8-(4'-clorometil) fenil-2,3,5,6,11,12,14,15 octahidro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino-8H-xanteno
H342	Hoechst 33342
Hz	Hertz

IA	inseminação artificial
IgG	Imunoglobulina G
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracoloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
kDa	quilodalton
kg	quilograma
L	litro
LIN	linearidade
Log	logarítmo
LYSO-G	LysoTracker Green
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
MITO	Mito Track Green FM [®]
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
n	número de unidades experimentais
nm	nanômetro
NRC	National Reseach Concil
P	nível de significância
PE	ficoeritrina
pH	concentração de íons de Hidrogênio
PI	iodeto de propídio
PIAIC	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Intacto e Com Função Mitocondrial
PIAIS	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Intacto e Sem Função Mitocondrial
PIALC	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Lesado e Com Função Mitocondrial
PIALS	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Lesado e Sem Função Mitocondrial
PLAIC	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Intacto e Com Função Mitocondrial
PLAIS	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Intacto e Sem Função Mitocondrial
PLALC	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Lesado e Com Função Mitocondrial
PLALS	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Lesado e Sem Função Mitocondrial
PNA	aglutinina de Amendoim (<i>Arachis hypogea</i>)

PSA	aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
r	coeficiente de correlação
R123	Rodamina 123
R ²	coeficiente de determinação
RCA	aglutinina de <i>Ricinus communis</i>
RNA	ácido ribonucléico
RQ	raiz quadrada
SAS	Statistical Analysis System (Sistema de Análise Estatística)
sptz	espermatozóides
STR	retilinearidade
T0	Sêmen fresco:Sêmen submetido a flash frozen, 0:100
T100	Sêmen fresco:Sêmen submetido a flash frozen, 100:0
T50	Sêmen fresco:Sêmen submetido a flash frozen, 50:50
TALP	meio de Tyrode com albumina, lactato e piruvato
VAP	velocidade do trajeto
VCL	velocidade curvilinear
VSL	velocidade progressiva
Ŷ	Estimativa de Y

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
<	menor que
>	maior que
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
±	mais ou menos
=	igual
+	mais / positivo
°	grau
-	menos / negativo
®	marca registrada
x	vezes
10 ⁶	milhões
:	para (1:100)
mOsm	miliosmol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	28
2 HIPÓTESES	32
3 OBJETIVOS	34
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	36
4.1 ESTRUTURA DO ESPERMATOZÓIDE.....	37
4.1.1 CABEÇA.....	38
4.1.2 FLAGELO.....	39
4.1.3 MEMBRANA PLASMÁTICA.....	41
4.2 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO.....	44
4.2.1 INTERAÇÕES DOS DILUIDORES NO RESFRIAMENTO, CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN.....	46
4.2.2 MODIFICAÇÕES DAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS SUBMETIDAS À CRIOPRESERVAÇÃO.....	50
4.3 AVALIAÇÕES DO SÊMEN BOVINO.....	52
4.3.1 USO DE SONDAS FLUORESCENTES NA AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA.....	53
4.3.1.1 AVALIAÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA.....	54
4.3.1.2 AVALIAÇÃO DO ACROSSOMO.....	57
4.3.1.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	59
4.3.1.4 AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA DA CROMATINA ESPERMÁTICA.....	64
4.3.2 ASSOCIAÇÕES DE SONDAS FLUORESCENTES.....	67
5 MATERIAL E MÉTODOS	70
5.1 LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL.....	71
5.2 ANIMAIS E MANEJO.....	71
5.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	71
5.4 <u>EXPERIMENTO 1</u> : AVALIAÇÃO SIMULTÂNEA DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCONDRIAL DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS PELA ASSOCIAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES	73

5.4.1 TESTES PRELIMINARES	73
5.4.2 COLHEITA DO SÊMEN	75
5.4.3 AVALIAÇÕES DO SÊMEN	75
5.4.4 VALIDAÇÃO DOS PROTOCOLOS PARA AVALIAÇÃO SIMULTÂNEA DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL E FUNÇÃO MITOCONDRIAL	76
5.4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	79
5.2 <u>EXPERIMENTO 2</u> : EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO SOBRE AS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL, MITOCONDRIAL E ESTRUTURA DA CROMATINA PELA UTILIZAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES	80
5.2.1 COLHEITA DO SÊMEN	82
5.2.2 AVALIAÇÕES DO SÊMEN PRÉ-CRIOPRESERVAÇÃO	82
5.2.2.1 VOLUME	82
5.2.2.2 CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA	82
5.2.2.3 MOTILIDADE E VIGOR	83
5.2.2.4 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA	83
5.2.2.5 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS ESPERMATOZÓIDES	84
5.2.2.6 AVALIAÇÃO DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCONDRIAL	84
5.2.2.7 ANÁLISE DA ESTRUTURA DA CROMATINA ESPERMÁTICA	85
5.2.3 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN	86
5.2.4 AVALIAÇÕES DO SÊMEN PÓS-CRIOPRESERVAÇÃO	88
5.2.4.1 MOTILIDADE E VIGOR	89
5.2.4.2 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA	89
5.2.4.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS ESPERMATOZÓIDES	89
5.2.4.4 AVALIAÇÃO DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCONDRIAL	89
5.2.4.5 ANÁLISE DA ESTRUTURA DA CROMATINA ESPERMÁTICA	90
5.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	90
6 RESULTADOS	92
6.1 <u>EXPERIMENTO 1</u> : ASSOCIAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES PARA AVALIAÇÃO SIMULTÂNEA DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCONDRIAL EM ESPERMATÓZIDES BOVINOS	93
6.2 <u>EXPERIMENTO 2</u> : EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO SOBRE AS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL, MITOCONDRIAL E ESTRUTURA DA CROMATINA PELA UTILIZAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES	115
6.2.1 VOLUME E CONCENTRAÇÃO	115

6.2.2 MOTILIDADE E VIGOR	116
6.2.3 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA	118
6.2.4 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	123
6.2.5 INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL E FUNÇÃO MITOCONDRIAL	124
6.2.6 INTEGRIDADE DA CROMATINA	131
6.2.7 CORRELAÇÕES	132
7 DISCUSSÃO	133
7.1 <u>EXPERIMENTO 1</u> : ASSOCIAÇÃO DAS SONDAS FLUORESCENTES PARA AVALIAÇÃO SIMULTÂNEA DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCONDRIAL EM ESPERMATOZÓIDES BOVINOS	134
7.2 <u>EXPERIMENTO 2</u> : EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO SOBRE AS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL, MITOCONDRIAL E ESTRUTURA DA CROMATINA PELA UTILIZAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES	143
7.2.1 EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE O MOVIMENTO ESPERMÁTICO	144
7.2.2 EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A MORFOLOGIA ESPERMÁTICA	149
7.2.3 EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE AS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCONDRIAL DOS ESPERMATOZÓIDES	150
7.2.4 EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A CROMATINA ESPERMÁTICA	159
7.2.5 CORRELAÇÕES	161
8 CONCLUSÕES	162
REFERÊNCIAS	165
ANEXOS	178

1 INTRODUÇÃO

A pecuária tem uma grande importância econômica para o Brasil, principalmente a pecuária de corte; visto que, o país é o segundo maior produtor e o maior exportador de carne bovina do mundo (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2004). Por sua grande extensão de terra, tem potencial para aumentar ainda mais a produção de carne, sendo que o aumento da produtividade pode ser obtido com o emprego de biotecnologias que otimizem o sistema de produção, buscando produzir mais por hectare, e assim diminuir os custos de produção. A utilização das biotecnologias aplicadas à reprodução, por sua vez, permite maximizar genéticas superiores para a obtenção de produtos de elevado ganho de peso e boa qualidade de carcaça.

A inseminação artificial em bovinos é uma biotecnologia reprodutiva de custos mais acessíveis e que serve como uma ferramenta para o melhoramento genético dos rebanhos. Todavia, para sua aplicação ampla é indispensável o uso do sêmen congelado.

Apesar dos primeiros relatos sobre a resistência dos espermatozóides ao processo de congelação datarem de 1776 por Spallanzani, seguida por Ivanov, foi somente a partir de 1949, quando os cientistas ingleses Polge, Smith e Parkes descobriram os efeitos crioprotetores do glicerol, que a criopreservação do sêmen tomou rumos mais importantes. Desde então, muitas pesquisas vêm sendo realizadas buscando novos agentes crioprotetores, meios de diluição e metodologias. No entanto, ainda é estimada uma perda em torno de 50% dos espermatozóides submetidos à congelação por danos ultra-estruturais, físicos, bioquímicos ou funcionais nos diferentes componentes da célula espermática.

As injúrias ocorridas nas membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozóides, ocasionadas pelo processo de criopreservação, são devido a alterações na

temperatura e na osmolaridade do meio que provocam mudanças morfológicas na organização e composição dos lipídios das membranas dos espermatozóides. A membrana plasmática exerce um papel fundamental na sobrevivência do espermatozóide no trato reprodutivo feminino e na manutenção de sua capacidade fertilizante, visto que, garante a homeostase celular, sendo essencial para manter a viabilidade. As mitocôndrias, localizadas na peça intermediária do espermatozóide, são responsáveis pela produção de ATP, que serve como fonte de energia para o batimento flagelar. Por outro lado, o acrossomo é indispensável para a fertilização. Dessa forma, as modificações ocorridas nas membranas, durante a criopreservação causam, como consequência, prejuízos na motilidade espermática, na produção de ATP e diminuição da capacidade fertilizante ou até a morte celular.

O emprego de diferentes diluidores que tenham a capacidade de fornecer maior proteção aos compartimentos celulares vem sendo estudado. O meio para a criopreservação deve fornecer um ambiente para conservar a integridade e função das membranas, o que pode ser obtido por diferentes combinações de componentes dos diluidores. Novos meios de diluição estão sendo desenvolvidos para a obtenção de maior preservação dos diferentes componentes celulares durante as mudanças de temperatura e de osmolaridade, pelas quais os espermatozóides devem passar durante o processo de criopreservação.

No entanto, a avaliação dos efeitos da criopreservação sobre os diferentes compartimentos das células espermáticas por técnicas que apresentem grande acurácia, maior objetividade e repetibilidade são de grande importância para auxiliar na escolha do diluidor ideal. Dentre as técnicas de avaliação do sêmen, grande ênfase vem sendo dada ao uso das sondas fluorescentes, por sua característica de marcar estruturas específicas das células e detectar integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara.

As sondas fluorescentes, para avaliação das membranas espermáticas, já têm sido empregadas nas pesquisas realizadas nos últimos anos. Todavia, a associação destas sondas,

de forma a permitir a avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, vem sendo realizada por protocolos laboriosos e demorados, tornando difícil sua aplicação na rotina da avaliação seminal.

Avaliações dos efeitos da criopreservação sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial por sondas fluorescentes, juntamente com o uso de sistemas computadorizados para a avaliação da motilidade espermática são esclarecedoras para determinar os efeitos que a criopreservação pode causar às células espermáticas de forma mais objetiva. Estas técnicas podem ainda auxiliar na avaliação dos efeitos crioprotetores de diferentes diluidores.

2 HIPÓTESES

1. A avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial pode ser realizada simultaneamente por uma técnica simples de associação de sondas fluorescentes.
2. A criopreservação afeta a motilidade espermática, bem como causa danos às membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina.
3. Diluidores com formulações diferentes atuam de forma distinta na proteção dos diversos compartimentos celulares durante a criopreservação.
4. Existem correlações entre alterações nas membranas e características de motilidade de espermatozóides bovinos criopreservados.

3 OBJETIVOS

Com base na literatura e nas hipóteses formuladas, este experimento foi delineado com os seguintes objetivos:

1. Desenvolver uma técnica simples, prática e com alta repetibilidade para avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial de espermatozóides bovinos pela associação de sondas fluorescentes.
2. Avaliar os efeitos da criopreservação sobre a motilidade espermática, membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóides bovinos.
3. Avaliar os efeitos de diferentes diluidores na criopreservação de espermatozóides bovinos sobre a motilidade espermática, membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estruturas da cromatina.
4. Verificar a existência de correlações entre alterações nas membranas e características de motilidade em espermatozóides bovinos criopreservados.

4 REVISÃO DE LITERATURA

A criopreservação do sêmen bovino apresentou um grande avanço a partir da descoberta dos efeitos crioprotetores do glicerol em 1949, desde então relativamente pouco progresso tem se obtido desta biotecnologia nesta espécie, apesar da importância e da grande aplicação do sêmen congelado na bovinocultura. Isso se deve ao fato de que os resultados práticos são satisfatórios, contudo, ainda muito há para se estudar, já que uma grande parte das células apresentam alterações da integridade e/ou funcionalidade quando submetidas à criopreservação (HOLT, 2000). Para um melhor entendimento dos efeitos da criopreservação sobre os espermatozóides bovinos é importante ressaltar alguns pontos da estrutura da célula espermática, dos mecanismos da criobiologia e das técnicas de avaliação espermática para a detecção acurada das crioinjúrias.

4.1 ESTRUTURA DO ESPERMATOZÓIDE

O espermatozóide é produzido dentro dos túbulos seminíferos dos testículos pela divisão e transformação das células tronco germinativas, em um processo chamado espermatogênese (EDDY; O'BRIEN, 1994; MRUK; CHENG, 2004).

O espermatozóide mamífero tem dois componentes principais, a cabeça e o flagelo ou cauda, unidos pelo colo, contendo a membrana plasmática cobrindo toda a célula (ÔURA; TOSHIMORI, 1990; EDDY; O'BRIEN, 1994; MORTIMER, 1997).

Toda a característica estrutural especializada do espermatozóide está voltada para sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético contido no

núcleo do espermatozóide para o oócito, onde a união dos pronúcleos masculino e feminino ocorre produzindo o zigoto (EDDY; O'BRIEN, 1994). Dessa forma, a função principal da cabeça do espermatozóide é a liberação de uma série haplóide de cromossomos para o oócito; enquanto, a do flagelo é promover motilidade à célula para permitir sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e penetração através da zona pelúcida do oócito (MORTIMER, 1997).

4.1.1 CABEÇA

A cabeça do espermatozóide possui o núcleo, o acrossomo e pequena quantidade de estruturas do citoesqueleto e citoplasma (ÕURA; TOSHIMORI, 1990; EDDY; O'BRIEN, 1994; FLESCHE; GADELLA, 2000).

A cromatina do núcleo espermático é altamente condensada e apresenta organização e quantidade de DNA características. O núcleo está envolvido pelo envelope nuclear (EDDY; O'BRIEN, 1994; ROUX et al., 2004).

O acrossomo é uma vesícula grande, originária do complexo de Golgi na espermátide, que contém enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração da matriz extracelular do oócito (zona pelúcida) para completar a fertilização (EDDY; O'BRIEN, 1994; FLESCHE; GADELLA, 2000) e está localizado na extremidade anterior da cabeça, entre o lado interno da membrana plasmática e o núcleo. Os componentes do citoesqueleto estão alojados nos espaços estreitos entre o acrossomo e o núcleo e entre o acrossomo e a membrana plasmática (EDDY; O'BRIEN, 1994).

Esta estrutura membranosa se dispõe sobre o núcleo como uma capa na porção anterior da cabeça do espermatozóide, sendo distinguida em membrana acrossomal interna e membrana acrossomal externa. A membrana acrossomal interna fica em contato com a membrana nuclear; enquanto, a membrana acrossomal externa está em contato com o lado

interno da membrana plasmática. O acrossomo consiste de dois segmentos, a capa acrossomal (acrossomo anterior) e o segmento equatorial (acrossomo posterior). Durante a reação acrossômica, a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática se fundem e formam vesículas liberando o conteúdo acrossomal. A membrana acrossomal interna e o segmento equatorial persistem até a fusão do espermatozóide com o oócito (ÕURA; TOSHIMORI, 1990; EDDY; O'BRIEN, 1994; FLESH; GADELLA, 2000).

Em espermatozóides bovinos, a membrana acrossomal externa possui um revestimento em sua superfície interna composta de glicoproteínas com diferentes pesos moleculares (290.000, 280.000, 260.000, 115.000, 81.000, 58.000, 46.000, 34.000 e 12.000 daltons) que possuem afinidades às lecitinas. Múltiplas enzimas estão presentes no acrossomo como acrosina, β -N-acetilglicosaminidase, fosfatase ácida, arilamidase, arissulfatase A, aspartilamidase, calpaína II, peptidase semelhante a catepsina D, peptidase semelhante a collagenase, peptidase dipeptidil, esterases não específicas, β -galactosidase, hialuronidase, fosfolipase A2 e fosfolipases C (EDDY, O'BRIEN, 1994). Durante a reação acrossômica o conteúdo acrossomal é liberado por exocitose mediada por cálcio. Após a descarga e ativação das enzimas acrossomais o espermatozóide penetra a zona pelúcida que rodeia o oócito, um processo que pode ser bloqueado por inibidores de proteases (ÕURA; TOSHIMORI, 1990; EDDY; O'BRIEN, 1994).

4.1.2 FLAGELO

O flagelo é composto pela peça intermediária, peça principal e peça terminal (ÕURA; TOSHIMORI, 1990; EDDY; O'BRIEN, 1994; MORTIMER, 1997).

Internamente, o flagelo é constituído pelo axonema, uma estrutura especializada do citoesqueleto, responsável pela motilidade espermática. O axonema é formado por nove

microtúbulos duplos localizados na periferia do cilindro e por dois microtúbulos simples centrais (ÔURA; TOSHIMORI, 1990; EDDY; O'BRIEN, 1994; COSSON, 1996). Os microtúbulos são organelas cilíndricas compostas por heterodímeros de tubulinas α e β , arranjados da cabeça para a cauda para formar um protofilamento polar. Treze protofilamentos se agregam para formar a parede entrelaçada do microtúbulo (BRINKEY, 1997). Os microtúbulos duplos são formados por um túbulo A (microtúbulo completo, com 13 protofilamentos) e um túbulo B (microtúbulo incompleto, formado por 11 protofilamentos de α e β tubulinas) (COSSON, 1996; BRINKLEY, 1997).

Os microtúbulos axonemais estão unidos por ligações protéicas. As pontes periódicas são ligações protéicas entre os microtúbulos simples centrais, os quais são envolvidos por uma bainha central. Os microtúbulos simples centrais são ligados aos microtúbulos duplos periféricos pelas projeções radiais. A união entre os túbulos A e B dos microtúbulos duplos periféricos é realizada pelas tekitinas, enquanto, a ligação entre os pares de microtúbulos duplos é feita pelas pontes de nexina e pelas dineínas. As dineínas consistem de braços interno e externo e representam os elementos principais do motor de propulsão, pois são responsáveis pela hidrólise de ATP em ADP e fosfato inorgânico, transformando energia química em trabalho mecânico, conduzindo ao batimento axonemal por permitir o deslizamento dos microtúbulos (COSSON, 1996; MORTIMER, 1997).

Cada molécula de dineína hidrolisa em torno de 50 moléculas de ATP por segundo, este valor está na mesma amplitude da frequência de batimento do flagelo do espermatozóide de ouriço do mar, 50 Hz (COSSON, 1996).

Externamente ao axonema, o flagelo possui nove fibras densas externas, cada uma associada a um microtúbulo duplo (ÔURA; TOSHIMORI, 1990; EDDY; O'BRIEN, 1994; MORTIMER, 1997). A fibra densa externa possui um córtex e uma medula e é constituída por proteína semelhante à queratina, o que confere elasticidade ao flagelo. O comprimento das

fibras varia se estendendo acima de 60% do comprimento da peça principal do flagelo, com duas fibras mais curtas, três fibras de comprimento médio e quatro fibras longas. Esta assimetria no comprimento das fibras densas pode desempenhar um papel importante na alteração progressiva do plano de batimento flagelar (MORTIMER, 1997).

A peça intermediária se estende do colo até o anulus, onde se conecta com a peça principal. Ela contém um arranjo helicoidal de mitocôndrias, as quais geram energia para o batimento flagelar (ÕURA; TOSHIMORI, 1990; MORTIMER, 1997).

A função fisiológica principal das mitocôndrias nas células vivas é realizar a fosforilação oxidativa e produzir ATP como origem de energia metabólica (ERNSTER; SCHATZ, 1981; BEREITER-HAHN, 1990; FREY; MANNELLA, 2000). A membrana mitocondrial interna é o local de produção de energia, sendo essencial para a suplementação de ATP para o batimento flagelar (ERNSTER; SCHATZ, 1981; MORTIMER, 1997).

A peça principal do flagelo se estende do anulus até a peça terminal e é caracterizada pela presença da bainha fibrosa. A bainha fibrosa é uma estrutura do citoesqueleto que rodeia o axonema e as fibras densas externas, fornecendo um suporte no controle e restrição do movimento flagelar. A peça terminal contém somente o axonema coberto pela membrana plasmática (ÕURA; TOSHIMORI, 1990; EDDY; O'BRIEN, 1994; MORTIMER, 1997).

4.1.3 MEMBRANA PLASMÁTICA

As membranas (plasmática, nuclear, acrossomal e mitocondrial) da célula espermática são agregados de lipídios e proteínas construídas durante a espermatogênese e modificadas durante o trânsito e armazenamento no epidídimo e ejaculação. A função das membranas é determinada pela interação de seus vários componentes; desse modo, algum

evento que modifique estas interações pode alterar sua função (ÕURA; TOSHIMORI, 1990; HAMMERSTEDT et al., 1990; FLESCHE; GADELLA, 2000).

A membrana plasmática é formada basicamente por uma bicamada lipídica com proteínas integrais e periféricas (endo e ectoproteínas), glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em um mosaico fluído (SINGER; NICHOLSON, 1972; ROBERTSON, 1981; EDDY; O'BRIEN, 1994), cujos componentes são segregados dentro de regiões específicas e domínios (HOLT, 1984; ÕURA; TOSHIMORI, 1990; EDDY; O'BRIEN, 1994). Na célula espermática madura pode-se identificar três regiões altamente especializadas da membrana plasmática: a cabeça do espermatozóide, envolvida na interação espermatozóide-oócito; a peça intermediária, que contém mitocôndrias envolvidas na produção de energia; e o flagelo, envolvido na motilidade (FLESCHE; GADELLA, 2000).

A membrana plasmática dos espermatozoides mamíferos tem uma pronunciada organização de domínios com muitos antígenos glicoprotéicos (WOLFE et al., 1998), sendo subdividida em domínios regionais bem delineados que diferem em composição e função. Esses domínios apresentam características dinâmicas que passam por mudanças na organização e composição durante a vida da célula (HOLT, 1984; ÕURA; TOSHIMORI, 1990; EDDY; O'BRIEN, 1994).

Na cabeça do espermatozóide, a membrana plasmática possui dois domínios maiores: região acrossomal e região pós-acrossomal. Na região acrossomal a membrana plasmática pode ser subdividida em segmento marginal (apical), segmento principal (acrossomal) e segmento equatorial. Os segmentos marginal e principal, juntos, são denominados de capa acrossomal. A membrana plasmática do flagelo é separada em domínio da peça intermediária, que cobre a bainha mitocondrial, e domínio da cauda posterior, que cobre as peças principal e terminal da cauda (EDDY; O'BRIEN, 1994).

A membrana plasmática da cabeça do espermatozóide é separada da membrana plasmática da peça intermediária pelo anel posterior, o qual é separado da membrana plasmática do flagelo pelo anel anular. Estes domínios diferentes contêm concentrações e distribuições de partículas intra-membranas variadas (FLESCHE; GADELLA, 2000).

Essa diferenciação regional com seus domínios específicos, que compõe a superfície espermática, é correlata com funções especializadas. Assim, moléculas envolvidas na reação acrossômica estão presentes no acrossomo anterior, moléculas envolvidas na fusão do espermatozóide com o oócito estão presentes sobre o acrossomo posterior e moléculas envolvidas na atividade flagelar estão associadas com a membrana plasmática do flagelo (ÔURA; TOSHIMORI, 1990; EDDY; O'BRIEN, 1994).

A difusão de lipídios na membrana plasmática de espermatozóides vivos varia significativamente entre os domínios de superfície, por causa da heterogeneidade da composição ou diferença na disposição da bicamada, ou ainda devido a presença de barreiras intra-membranas que impede a troca livre entre os domínios (HOLT, 1984; WOLFE et al., 1998). Tal afirmação enfatiza a importante função dos lipídios de membrana em regular a migração polarizada de antígenos da superfície espermática durante o processo de desenvolvimento tais como maturação e capacitação (WOLFE et al., 1998).

A composição lipídica da membrana plasmática apresenta uma variação considerável entre as diferentes espécies de mamíferos, em geral ela contém 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios. Os fosfolipídios podem ser divididos em fosfoglicerolipídios (fosfocolina, fosfoetanolamina, fosfatidilserina, cardiolipina e fosfatidilinositol) e esfingomielina. Os lipídios neutros incluem o colesterol e pequena quantidade de desmosterol, sulfato de colesterol e éster colesteril. Os glicolipídios encontrados na célula espermática são seminolipídios e traços de outros glicolipídios (FLESCHE; GADELLA, 2000).

As membranas biológicas apresentam um arranjo assimétrico dos fosfolipídios dentro da bicamada, o que garante sua estabilidade e função para cada demanda celular, assim, cada tipo de fosfolipídio tem uma orientação preferencial específica. Sabe-se que a fosfatidilserina, fosfatidiletolamina e fosfatidilinositol estão localizadas primariamente no lado citoplasmático da bicamada; enquanto, a fosfatidilcolina, esfingomiéline e glicolipídios são encontrados essencialmente no lado exoplasmático do folheto (HAMMERSTEDT et al., 1990; WOLFE et al., 1998).

As membranas espermáticas apresentam-se em um estado líquido, sendo esta característica um pré-requisito para o desempenho de suas funções. Os principais fatores que afetam esta fluidez são sua composição relativa entre fosfolipídios e colesterol e a temperatura à qual a membrana é exposta (HAMMERSTEDT et al., 1990). A manutenção do estado líquido dos lipídios e das proteínas de membrana permite a movimentação livre dos componentes, o que garante suas interações (HAMMERSTEDT et al., 1990; FLESCHE; GADELLA, 2000).

As interações entre proteínas e lipídios que ocorrem dentro da membrana são extremamente importantes para o desempenho das funções celulares. Alguns lipídios são preferencialmente agrupados ao redor de proteínas de membrana integrais e o ambiente lipídico ao redor de uma proteína influencia as propriedades funcionais da unidade agregada (ÔURA; TOSHIMORI, 1990; HAMMERSTEDT et al., 1990; WOLFE et al., 1998).

4.2 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO

A criopreservação do sêmen busca a suspensão do metabolismo espermático e a manutenção de suas características por um período de tempo prolongado. O sucesso da

criopreservação do sêmen depende da manutenção do potencial fertilizante dos espermatozóides, que devem apresentar integridade e funcionalidade das diferentes estruturas celulares (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; MEDEIROS et al., 2002). Para isso, os espermatozóides devem manter integridade do flagelo (para garantir produção de ATP e motilidade), do núcleo (para manter estável o armazenamento do DNA), do acrossomo (para manter a fecundação) e da superfície do segmento equatorial (para que ocorra a ligação ao oócito) (AMANN; PICKETT, 1987; ÔURA; TOSHIMORI, 1990; HAMMERSTEDT et al., 1990).

O processo de criopreservação do sêmen é dividido em passos distintos: diluição, resfriamento, congelação, armazenamento e descongelação. Cada um desses passos tem sua relação com a estrutura funcional das membranas e metabolismo celular (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990). A preservação das estruturas espermáticas após a congelação é obtida por uma interação entre diluidor, crioprotetor, curvas de resfriamento e congelação e descongelação, buscando minimizar os danos causados pelo choque frio, formação de cristais de gelo e desidratação celular (AMANN; PICKETT, 1987; JASKO, 1994; YOSHIDA, 2000).

A mudança de temperatura durante o resfriamento da célula altera as propriedades físicas de todas as membranas celulares. A adição de crioprotetor penetrante altera o volume celular. A congelação altera a estrutura e o volume da membrana. O armazenamento, por sua vez, representa o estado de dormência celular. Por fim, quando a célula é descongelada, ou seja, passa por reaquecimento e é removida do diluidor de armazenagem, deve ocorrer o processo inverso, com a recuperação e expansão da membrana (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995). É bem estabelecido que para uma ótima sobrevivência celular a taxa de descongelação a ser aplicada deve levar em consideração a taxa de congelação escolhida (MAZUR, 1984; WATSON, 1995).

Os danos celulares pela congelação podem ocorrer em qualquer um dos passos do processo; no entanto, eles serão detectados somente depois que a célula já passou por todos os tratamentos, sendo mais difícil, se não impossível, fazer uma análise detalhada dos espermatozóides quando eles estão em baixas temperaturas e em estado semi-sólido. É sempre necessário completar todo o procedimento e analisar as células em suspensão, e então atentar para designar o ponto de alteração deletéria da célula, de forma que modificações nos procedimentos possam ser preconizadas para amenizar os danos. A sobrevivência espermática requer soluções simultâneas de uma equação multifatorial relatando as probabilidades de danos em todos os compartimentos celulares (HAMMERSTEDT et al., 1990).

4.2.1 INTERAÇÕES DOS DILUIDORES NO RESFRIAMENTO, CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN

O diluidor deve interagir com o sêmen e proporcionar proteção aos diferentes compartimentos celulares durante o resfriamento, congelação e descongelação. Por isso, sua constituição deve garantir nutrição, proteção, balanço eletrolítico (pH e osmolaridade) e inibição bacteriana. Os constituintes básicos dos diluidores são substâncias energéticas, crioprotetores, soluções tampões e antibióticos (GRAHAM, 1995; SQUIRES et al., 1999; HOLT, 2000).

Existem muitos relatos acerca do meio de diluição para sêmen. Cada diluidor, desde uma simples solução salina até os meios tamponados mais complexos, tem seu próprio mérito. A busca da preservação do sêmen parte do princípio que a sobrevivência dos espermatozóides por longos períodos é inversamente relacionada com sua atividade metabólica. A eficiência em armazenar o sêmen congelado envolve uma completa suspensão do metabolismo das células espermáticas (WATSON, 1995; VISHWANATH; SHANNON, 2000).

Os crioprotetores podem ser classificados como penetrantes e não penetrantes, de acordo com sua capacidade em atravessar a membrana plasmática. Os crioprotetores penetrantes são moléculas pequenas como glicerol, etilenoglicol, propilenoglicol, propanodiol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, que atravessam a membrana plasmática e atuam nos meios intra e extracelulares (DE LEEUW et al., 1993; GRAHAM, 1995; SZTEIN et al., 2001). Estas substâncias agem como solvente e soluto, contribuindo com a pressão osmótica intra e extracelular. Entre estes crioprotetores, o glicerol tem merecido destaque, pois ainda é o que apresenta melhores resultados na preservação do sêmen bovino (GRAHAM, 1995; FORERO-GONZALEZ, 2004).

Os crioprotetores não penetrantes não conseguem atravessar a membrana plasmática, são moléculas grandes, como proteínas (da gema do ovo e do leite desnatado), açúcares (frutose, glicose, manose, rafinose ou trealose), polímeros sintéticos (polivinilpirrolidona e metilcelulose) e amidas, que atuam no meio extracelular, ou seja, agem como solutos ou colóides (DE LEEUW et al., 1993; GRAHAM, 1995; COTTORELLO; HENRY, 2002). Todos os solutos e colóides numa solução contribuem para as propriedades osmóticas e afetam o movimento de água para dentro e para fora da célula (GRAHAM, 1995; HOLT, 2000). Os lipossomos da bicamada que contém proteínas ligadas não sofrem perdas na congelação, o que é um indicativo de que proteínas parecem estabilizar a bicamada por providenciar maior hidratação da superfície da membrana e pela ligação hidrofóbica adicional no interior da membrana (STRAUSS; INGENITO, 1980).

As interações que ocorrem durante a congelação entre o diluidor e os espermatozóides são descritas. Os crioprotetores penetrantes, que têm propriedade solvente, possuem o ponto de congelação muito mais baixo do que o da água. Com a congelação do diluidor do sêmen, a água pura congela primeiro e forma cristais de gelo, entre estes cristais de gelo ficam canais de diluidor não congelado, onde os espermatozóides ficam alojados.

Com a água congelada, aumenta a concentração de soluto, o que aumenta a osmolaridade do meio extracelular e promove o egresso de água da célula, conseqüentemente o espermatozóide irá desidratar, diminuindo seu volume, pois a água passa mais rapidamente através da membrana do que o crioprotetor penetrante. Este processo evita o acúmulo de água e a formação de cristais de gelo intracelular. Esta mudança dura até que o crioprotetor penetrante entre na célula em quantidades suficientes para restaurar o volume celular inicial (MAZUR, 1984; WATSON, 1995; GRAHAM, 1995; HOLT, 2000; WATSON, 2000).

Apesar da importância da presença do crioprotetor penetrante como o glicerol, há evidências de que o glicerol é tóxico ao espermatozóide e parte de sua toxicidade é devida a injúrias bioquímicas resultantes da ação direta do crioprotetor sobre os componentes subcelulares, mas danos osmóticos também podem ocorrer (GRAHAM, 1995). Na ausência de crioprotetor, a congelação causa de 30 a 40% de destruição dos lipossomos não ligados a proteínas da bicamada. Altas concentrações (10 a 20%) de crioprotetor desestabilizam os lipossomos mesmo antes da congelação, pois dissolvem os fosfolípidos, enquanto, em concentrações moderadas, previnem os efeitos prejudiciais da desidratação dos lipídios na congelação (STRAUSS; INGENITO, 1980).

Outros crioprotetores vem sendo testados na busca de minimizar os efeitos tóxicos dos crioprotetores e a obtenção de melhores resultados de congelação. Para espermatozóides eqüinos, a dimetilformamida vem sendo utilizada como crioprotetor penetrante com resultados superiores ao glicerol (ALVARENGA, 2002; MEDEIROS, 2003). Todavia, a criopreservação do sêmen bovino com diluidor à base de tris-gema apresentou melhores resultados quando associado ao glicerol, como crioprotetor penetrante, do que quando associado ao etilenoglicol ou dimetilformamida, pois o diluidor contendo glicerol preservou melhor motilidade, vigor, função mitocondrial, integridade das membranas plasmática e acrossomal (FORERO-GONZALEZ, 2004).

O resfriamento dos espermatozóides abaixo de 0° C em uma taxa lenta promove maior egresso de água da célula do que quando o resfriamento é realizado numa taxa rápida. Dessa forma, um resfriamento muito lento pode levar a uma desidratação celular muito intensa, enquanto, um resfriamento muito rápido é insuficiente para permitir o egresso da água, o que acarreta a formação de cristais de gelo intracelular. A taxa de resfriamento ideal deve ser relativamente rápida resultando em suficiente e não excessiva retirada de água intracelular, o que pode levar a formação de cristais de gelo intracelulares, pequenos e não letais, proporcionando boas condições de sobrevivência da célula após o reaquecimento. Quando a taxa de resfriamento é mais lenta ou mais rápida do que a ideal, os danos celulares podem ser abrandados por taxas de reaquecimento apropriadas. Em geral, quando o resfriamento é feito com taxas mais rápidas a descongelação deverá ser rápida. As taxas de resfriamento e descongelação ideais também são influenciadas pela composição do diluidor e pelas concentrações de crioprotetor penetrante (AMANN; PICKETT, 1987; GRAHAM, 1995; WATSON, 1995; SQUIRES et al., 1999).

Quando resfriado rapidamente de 37° C ou 20° C para 0° C, o espermatozóide apresenta uma série de mudanças denominadas choque frio. O choque frio é evidenciado por muitos espermatozóides em movimento circular, perda prematura da motilidade, diminuição da produção de energia, aumento da permeabilidade da membrana e perda de moléculas e íons intracelulares. Estas alterações são devidas a danos nas membranas espermáticas, as quais são bioquimicamente diferentes, mas apresentam estruturas semelhantes (AMANN; PICKETT, 1987; MEDEIROS et al., 2002). O choque frio pode ser minimizado pelo resfriamento lento do sêmen diluído de 20° C até 4° C, numa taxa de 0,05° C/minuto (SQUIRES et al., 1999) e pela adição de proteínas do leite ou da gema de ovo nos diluidores de sêmen (AMANN; PICKETT, 1987). A gema do ovo possui lipoproteínas de baixa densidade, principalmente a fosfatidilcolina, que são responsáveis pela ação protetora das membranas (WATSON, 1995).

A adição de lipoproteína isolada ao diluidor preserva melhor a qualidade e a capacidade de fertilização do sêmen bovino após o processo de congelação e descongelação do que a adição de gema de ovo (AMIRAT et al., 2004).

A descongelação envolve o processo inverso, forçando a célula a retroceder seu curso pela passagem de várias mudanças de fase, e tem como resultado o fluxo de água para dentro da célula. A taxa de mudança de temperatura deve permitir o movimento de água e de crioprotetor sem a formação de gelo intracelular ou mudanças irreversíveis na membrana. A ruptura citoplasmática devido a formação de cristais de gelo intracelular é maior durante a descongelação, num processo denominado de “recristalização” (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995; HOLT, 2000).

4.2.2 MODIFICAÇÕES DAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS SUBMETIDAS À CRIOPRESERVAÇÃO

Cada camada da membrana possui uma única distribuição de lipídios e proteínas, a qual está relacionada com sua função, por isso, são susceptíveis a uma forma única de alteração durante o processo de congelação e descongelação. Com base nessas informações, a proteção de cada compartimento individual dos danos requer a evolução de um protocolo que satisfaça as necessidades de cada subsistema (WATSON, 1995; HAMMERSTEDT et al., 1990).

Durante o resfriamento, as mudanças de temperatura produzem alterações físicas na membrana a qual passa do estado líquido ao de gel, quando as cadeias de ácidos graxos se encontram aleatoriamente distribuídas e ordenam-se paralelamente, produzindo uma estrutura rígida, tornando estas áreas fracas e susceptíveis a rupturas, fusões e permeáveis a íons (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995; HOLT, 2000). O aquecimento pode inicialmente produzir padrões de associações de lipídios e proteínas

diferentes daqueles de antes do processamento. O estado original, com suas propriedades de membrana específicas, pode ser restabelecido com o tempo, quando a difusão permitir a reconstrução dos componentes em seu arranjo original (HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995).

O movimento de água e crioprotetor através das membranas é importante para que ocorra a desidratação celular para a congelação e seu restabelecimento durante a descongelação. Mudanças nas membranas causadas pela organização dos lipídios pode afetar a cinética do transporte de água e crioprotetor (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995).

Em razão dos espermatozóides ficarem alojados nos canais de diluidor não congelado, uma única célula pode ser exposta a alta e baixa concentração de solutos simultaneamente. O estudo da microestrutura pode ajudar a explicar porque alguns espermatozóides sobrevivem ao processo de criopreservação intactos, enquanto outros sofrem rupturas acrossomais, danos na membrana plasmática e perda na motilidade. Se a sobrevivência celular for dependente da orientação espacial em relação às regiões de distribuição heterogênea da concentração de solutos, assim tipos diferentes de microestruturas teriam probabilidades casualizadas de alcançar a orientação ideal (HOLT, 2000).

Durante o processo de criopreservação ocorrem mudanças também na arquitetura mitocondrial (COUNTERS et al., 1989). No resfriamento a 5°C estas mudanças incluem condensação e perda de material mitocondrial (JONES; MARTIN, 1973) ou alterações na forma da mitocôndria (WOOLLEY; RICHARDSON, 1978). Após o choque frio, alterações mitocondriais incluem aparência mais clara e perda de proteínas, confirmadas histoquimicamente (QUINN et al., 1969).

Espermatozóides submetidos a congelação apresentam grandes cristais de gelo nas mitocôndrias e, após a descongelação, perdas de conteúdo estrutural. Portanto, como a

fosforilação oxidativa e o transporte de prótons são realizados na membrana, é provável que a produção de ATP seja prejudicada nesse processo (WATSON, 1995).

4.3 AVALIAÇÕES DO SÊMEN BOVINO

O desenvolvimento de ensaios laboratoriais para prever com acurácia a capacidade fertilizante do sêmen tem instigado há muitos anos os pesquisadores. No entanto, nenhum teste laboratorial isolado pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen, uma vez que, para ser capaz de fertilizar o oócito e permitir o desenvolvimento embrionário, os espermatozóides precisam apresentar diversos atributos (GRAHAM et al., 1990; ARRUDA, 2000; BRAUNDMEIER; MILLER, 2001; ARRUDA et al., 2003).

Para garantir a fertilidade, o sêmen deve apresentar características mínimas de concentração, motilidade e características morfológicas dos espermatozóides, as quais são parâmetros clássicos na avaliação de amostras de sêmen. Usualmente, a motilidade espermática é estimada de forma subjetiva, sendo analisada sob microscopia óptica, com uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se sua porcentagem visualmente. Por sua vez, as anormalidades espermáticas são avaliadas em esfregaços corados ou câmara úmida, em uma avaliação que depende da habilidade do técnico. Entretanto, estudos reportam que este tipo de análise manual é impreciso, mesmo quando executado por investigadores experientes. As análises são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores. Esta imprecisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implementação de padrões para a avaliação (ARRUDA, 2000; VERSTEGEN et al., 2002; ARRUDA et al., 2003; ARRUDA et al., 2004).

Uma grande diversidade de biotécnicas vem sendo desenvolvida para a avaliação seminal, das quais pode-se citar sistemas de avaliação computadorizada das características seminais, uso de sondas fluorescentes para a avaliação das estruturas espermáticas por microscopia de epifluorescência ou sistema de citometria de fluxo, técnicas de sexagem espermática, testes hipoosmóticos, avaliação de proteínas do plasma seminal, produção de espécies reativas de oxigênio, entre outras (ARRUDA et al., 2003; ARRUDA et al., 2004).

4.3.1 USO DE SONDAS FLUORESCENTES NA AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

A fluorescência foi descrita pela primeira vez em 1833 por Brewster, após observar que a luz do sol provocava uma incandescência vermelha em soluções de clorofila. Foi somente em 1852, que Stokes realizou os primeiros estudos com fluorescência, observando o brilho do mineral espatoflúor (fluorspar, em inglês) na luz solar, designando o nome fluorescência (fluorescence, fluor + escence). A primeira aplicação da fluorescência na química analítica foi creditada para Goppelsröder em 1868. Na metade do século XX, os químicos empregavam a fluorescência como meio de estudar o estado de energia de moléculas e para investigar a transferência de energia entre moléculas ou entre diferentes estados da mesma molécula. A partir da década de 1950 começaram a surgir aparelhos mais sofisticados para a avaliação da fluorescência, o que estendeu o uso da fluorimetria como um instrumento analítico (ELEVITCH, 1973).

A fluorescência é um indicador sensível e específico do estado de certas moléculas (oxidadas x reduzidas, ionizadas x não ionizadas, livres x ligadas), podendo ser aplicada como um meio de medir mudanças metabólicas dentro de células vivas (HAUGLAND, 2001).

O emprego das sondas fluorescentes na andrologia busca avaliar integridade e função de compartimentos específicos da célula espermática (PETERSON et al., 1974; HALANGK et al., 1984).

4.3.1.1 AVALIAÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA

A membrana plasmática é responsável pelo mecanismo de manutenção do equilíbrio osmótico celular, atuando como uma barreira entre os meios intra e extracelulares. Danos nesta estrutura podem levar a perda da homeostase com posterior morte da célula (AMANN e PICKETT, 1987). Assim, a integridade da membrana plasmática exerce papel fundamental para a sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e para a manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS e GRAHAM, 1992).

Os estudos iniciais para a avaliação da integridade da membrana plasmática em espermatozóides com o uso de corantes ou sondas fluorescentes citam o emprego do brometo de etídio para sêmen humano (PETERSON et al., 1974), de galos (BILGILI; RENDEN, 1984) e de touros (HALANGK et al., 1984). Esta sonda não atravessa a membrana plasmática intacta mas, uma vez permeabilizada a membrana, este corante entra na célula e tem especificidade ao DNA e, quando intercalado à dupla hélice do DNA, a emissão de sua fluorescência aumenta onze vezes (PAL et al., 1998). Sua aplicação foi citada para determinar no sêmen o número de células com a membrana plasmática lesada e a concentração espermática. Para isso, uma amostra do sêmen foi colocada numa solução contendo brometo de etídio, o qual atravessa a membrana danificada das células e se liga ao DNA, emitindo fluorescência. A detecção de sua fluorescência foi realizada em um fluorímetro, obtendo-se a unidade fluorimétrica correspondente ao número de células com membrana plasmática lesada. Em seguida, adicionou-se uma alíquota de digitonina, substância que solubiliza a molécula de

colesterol da membrana plasmática e torna todas as membranas plasmáticas permeáveis ao brometo de etídio. A leitura no fluorímetro foi repetida para obter a unidade fluorimétrica correspondente ao número de espermatozóides totais (BILGILI; RENDEN, 1984; HALANGK et al., 1984).

Devido à alta toxicidade do brometo de etídio, principalmente para quem o manipula, sua aplicação tem sido restringida. O iodeto de propídio (PI), um corante fluorescente com propriedades similares passou a ser utilizado. A aplicação do fluorímetro com PI para avaliar a integridade de membrana plasmática em espermatozóides criopreservados de touros, foi realizada por Alm et al. (2001). Todavia, a aplicação do PI como marcador da integridade da membrana plasmática vem sendo realizada mais amplamente por microscopia de epifluorescência (GARNER et al., 1997; SUKARDI et al., 1997; THOMAS et al., 1997) ou por sistema de citometria de fluxo (GRAHAM et al., 1990; THOMAS et al., 1998).

O PI possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (GARNER et al., 1986; GARNER et al., 1988; BAYYARI et al., 1990; GRAHAM et al., 1990; MAXWELL et al., 1997; ARRUDA, 2000, ARRUDA et al., 2003a). Outros corantes fluorescentes também têm sido usados para a determinação da integridade da membrana plasmática. Os corantes supravitais Hoechst 33258 (H258) e 33342 (H342) são utilizados para verificar integridade de membrana plasmática, se ligam especificamente ao DNA e marcam em azul o núcleo da célula (CASEY et al., 1993; MAXWELL et al., 1997). O H258 não atravessa a membrana plasmática intacta, marcando as células com membrana plasmática lesada (DE LEEUW et al., 1991), enquanto o H342 é permeável à membrana plasmática intacta, atuando como um marcador de membrana plasmática intacta quando associado com outra sonda de coloração distinta, como por exemplo, o PI (CASEY et al., 1993; MAXWELL et al., 1997). O SYBR-14 também é uma sonda fluorescente com especificidade ao DNA. Ele atravessa a membrana plasmática intacta,

cora o núcleo dos espermatozóides de verde, também usado como contra-corante, associado, principalmente, ao PI (THOMAS et al., 1998; SEGOVIA et al., 2000). Outra sonda utilizada para marcar integridade de membrana é o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA). O diacetato de carboxifluoresceína é hidrolisado por esterases, produzindo diacetato de carboxifluoresceína livre que é retida dentro da célula com a membrana plasmática intacta, exibindo uma fluorescência de coloração verde amarelada (HARRISON; VICKERS, 1990; VALCÁRCEL et al., 1994; PEÑA et al., 1998; SOUZA, 2001).

A eficiência do PI em avaliar a integridade da membrana plasmática de espermatozóides de touros foi testada. Para isso amostras de sêmen foram submetidas à congelção rápida em nitrogênio líquido (*flash frozen*) e quatro tratamentos foram preparados com as proporções de sêmen fresco:sêmen *flash frozen*, 1:0, 1:3, 1:1 e 3:1 (volume:volume). As amostras tratadas foram avaliadas utilizando PI em citometria de fluxo e eosina/nigrosina por microscopia óptica. Após análise de regressão, um intervalo de confiança de 95% entre as técnicas foi obtido, indicando que PI é um corante supravital acurado para análise de espermatozóides bovinos por citometria de fluxo (GRAHAM et al., 1990).

Por ser um corante fluorescente muito estável, o PI vem sendo utilizando em uma grande quantidade de trabalhos, apresentando êxito nos resultados tanto em microscopia de epifluorescência quanto em sistema de citometria de fluxo (GARNER et al., 1986; GARNER et al., 1988; BAYYARI et al., 1990; GRAHAM et al., 1990; VALCÁRCEL et al., 1994; MAXWELL et al., 1997; GARNER et al., 1997; SUKARDI et al., 1997; THOMAS et al., 1997; PEÑA et al., 1999; THOMAS et al., 1998; GARNER et al., 1999; ARRUDA, 2000, PINTADO et al., 2000; HUO et al., 2002; SOUZA, 2001; ARRUDA et al., 2003a; BRITO et al., 2003; FORERO-GONZALEZ, 2004; PETRUNKINA et al., 2005; GILLAN et al., 2005).

4.3.1.2 AVALIAÇÃO DO ACROSSOMO

A reação acrossômica, caracterizada pela liberação das enzimas acrossomais, é um evento essencial para a penetração do espermatozóide na zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito (DIAZ-PERES et al., 1988). Portanto, a integridade do acrossomo, bem como a manutenção de suas enzimas, são cruciais para que ocorra a fertilização (ÔURA; TOSHIMORI, 1990; FLESCHE; GADELLA, 2000; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A integridade do acrossomo pode ser verificada por diferentes técnicas de fluorescência. A natureza ácida do acrossomo intacto sugere o uso de sondas acidofílicas tais como o LysoTracker Green DND-26 (LYSO-G) como um marcador da integridade acrossomal (THOMAS et al., 1997). Marcadores dos constituintes acrossomais tanto enzimaticamente quanto imunologicamente também podem ser usados. Marcadores enzimáticos da acrosina, como inibidores da protease serina, são ferramentas fluorescentes de mensuração da integridade acrossomal (PALENCIA et al., 1996). Técnicas de imunofluorescência também podem identificar acrossomos lesados por preenchimento secundário com fluoróforos, como o uso de anticorpos anti-acrosina (THOMAS et al., 1997) e anticorpos anti-hialuronidase (BACCETTI et al., 1999). Ainda, o caráter glicoprotéico dos componentes acrossomais fornece um outro meio de mensurar a integridade acrossomal, por preenchimento fluorescente da matriz acrossomal de espermatozoides com acrossomo lesado com lecitinas marcadas (GRAHAM et al., 1990).

As aglutininas, tais como aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), aglutinina de *Ricinus communis* (RCA), aglutinina de *Arachis hypogaea* (PNA) (CROSS e MEIZEL, 1989) ou *Concanavalia ensiformis* (ConA), que possuem especificidade a glicoproteínas da membrana acrossomal, têm sido usadas para determinar a integridade acrossomal. Para a visualização do

acrossomo espermático em microscopia de epifluorescência, estas aglutininas devem ser conjugadas a fluoresceínas, tais como o isotiocionato de fluoresceína (FITC) (FARLIN et al., 1992; HOLDEN et al., 1990).

A aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), é uma aglutinina da ervilha, que se liga aos glicoconjugados da matriz acrossomal (CROSS e MEIZEL, 1989), tem afinidade para as terminações α -D-glicosil e resíduos α -D-manosil de glicoproteínas, se ligando especificamente ao açúcar α -manosidase encontrado no conteúdo acrossomal (CROSS et al., 1986). Esta aglutinina, quando conjugada à isotiocionato de fluoresceína (FITC), marca com sucesso o acrossomo espermático em verde amarelado, facilita a visualização e identifica acrossomos lesados, podendo ser aplicado aos espermatozóides humanos (CROSS et al., 1986; MENDOZA et al., 1992; TESARIK et al., 1993), bovinos (GRAHAM et al., 1990), eqüinos (FARLIN et al., 1992; CASEY et al., 1993; ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003a) e suínos (MATTIOLI et al., 1996).

Graham et al. (1990) testaram o uso do FITC-PSA para a avaliação da integridade acrossômica em espermatozóides bovinos. Eles induziram a reação acrossomal nas amostras de sêmen utilizando lipossomos de dilauroilfosfatidilcolina e lisofosfatidilcolina. Após a indução da reação acrossomal as amostras foram avaliadas para a integridade acrossomal com FITC-PSA por citometria de fluxo e por amarelo de naftol/eritrosina b. Verificaram que ambos, FITC-PSA e amarelo de naftol/eritrosina b, foram eficientes em detectar danos acrossomais, sendo que o FITC-PSA apresentou uma porcentagem de 6% a mais de acrossomo danificado do que o amarelo de naftol/eritrosina b.

O uso da FITC-PSA para avaliar a integridade do acrossomo de células espermáticas eqüinas a fresco ou submetidas à crioinjúria foi investigado (FARLIN et al., 1992; ARRUDA et al., 2003b). Para tanto, misturas de diferentes proporções de espermatozóides com acrossomo intacto (sêmen fresco) e espermatozóides com acrossomo danificado (sêmen

criopreservado) foram avaliadas. Houve correlação positiva entre a porcentagem de espermatozóides ligados ao FITC-PSA e a proporção de espermatozóides com acrossomo danificado nas amostras ($r = 0,98$; $P < 0,05$), comprovando a eficiência de seu uso na determinação da integridade do acrossomo de espermatozóides (FARLIN et al., 1992).

Também em espermatozóides eqüinos, Souza (2001) comparou, após a criopreservação dos espermatozóides, o percentual de acrossomo lesado detectado pelas técnicas de câmara úmida por microscopia de contraste de fase e de interferência diferencial, técnica de coloração por Tripán Blue/Giemsa e o uso do FITC-PSA. Verificou que o FITC-PSA foi mais eficiente em detectar lesão de acrossomo do que as outras técnicas.

4.3.1.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL

A síntese de ATP mitocondrial é dirigida pelo potencial de membrana mitocondrial interno que é gerado pela cadeia respiratória. A capacidade para monitorar mudanças no potencial de membrana em mitocôndrias *in situ* dentro de células pode ser crucial para a interpretação de mudanças na fisiologia celular em várias situações experimentais (DUCHEN et al., 1993).

Nas células espermáticas as mitocôndrias estão dispostas de forma helicoidal na peça intermediária e o ATP produzido serve como suplemento energético para os batimentos flagelares. Portanto, é indispensável que haja produção de ATP pelas mitocôndrias para haver motilidade espermática (COSSON, 1996).

Muitos indicadores para o monitoramento do potencial de membrana de mitocôndrias têm sido discutidos com grande ênfase em favor das sondas fluorescentes. Os componentes com sensibilidade ao potencial de membrana mitocondrial mais comuns são as

rodaminas e as carbocianinas. O sucesso para o uso dessas sondas em células vivas é baseado no fato de não serem destrutivas nem causarem toxicidade (REERS et al., 1991).

Rodamina 123 (R123) é um fluorocromo capaz de corar mitocôndrias e promover imagens de alta fluorescência de mitocôndrias em células vivas (BENEL et al., 1986). É um componente catiônico que excita a 488 nm e emite fluorescência verde a 515-575 nm.

Graham et al. (1990) afirmaram que a sonda R123 pode ser utilizada para detectar mitocôndria funcional em célula espermática, pois avaliaram espermatozóides bovinos usando citometria de fluxo e observaram que o corante R123 acumulou e foi retido mais intensamente em mitocôndria completamente funcional. Os autores notaram ainda que a função mitocondrial, mensurada pela fluorescência emitida por R123, foi deprimida por inibidores mitocondriais (rotenona ou monensina), o que indicou que os danos mitocondriais podem ser detectados por esta sonda.

No entanto, Salvioli et al. (1997) afirmaram que R123 identifica somente uma população de células com função mitocondrial, não possuindo a capacidade de diferenciar mitocôndrias com potencial de membrana alto ou baixo.

Um tipo especial de multímeros de carbocianinas, que foi identificado primeiramente por Jelly (1937) e por isso chamado J-agregados (3,3'-dipentiltioldicarbocianina), tem sido explorado para visualizar mitocôndrias em uma variedade de células, sendo o mais utilizado o corante identificado como sendo o iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) (REERS et al., 1991).

O JC-1 identifica populações de mitocôndrias com diferentes potenciais de membrana através de códigos de cor. Sua cor é alterada do verde para o laranja ou vermelho, com o aumento do potencial de membrana (REERS et al., 1991; COSSARIZZA et al., 1993). A fluorescência verde do JC-1 ocorre devido à formação de monômeros, apresentando excitação e emissão máximas de 510 e 527 nm, respectivamente, enquanto a fluorescência

vermelha do JC-1 é devido à formação de J-agregados, com excitação e emissão máximas de 485 e 585 nm, respectivamente (HAUGLAND, 2001).

A sonda fluorescente JC-1 vem sendo utilizada como um suporte no diagnóstico de infertilidade humana, identificando espermatozóides com baixo potencial de membrana mitocondrial (TROIANO et al., 1998). Pode detectar acuradamente mudanças no potencial de membrana de espermatozóides eqüinos (GRAVANCE et al., 2000) e murinos (GRAVANCE et al., 2001). Ainda vem sendo utilizada para avaliar os efeitos da criopreservação (GARNER et al., 1997; THOMAS et al., 1998; GARNER et al., 2001) e da adição do glicerol sobre o potencial de membrana de mitocôndrias de espermatozóides bovinos (GARNER et al., 1999).

Thomas et al. (1998) realizaram análises de correlações entre as avaliações do potencial de membrana mitocondrial por JC-1 e da motilidade antes e após o processo de criopreservação. Os autores verificaram que a motilidade antes da criopreservação foi negativamente correlacionada com a proporção de mitocôndrias que apresentaram fluorescência verde ($r = -0,81$), isto é, com baixo potencial de membrana e positivamente correlacionada com a proporção de mitocôndrias que apresentaram fluorescência vermelha-alaranjada ($r = 0,60$), com alto potencial de membrana. Todavia, estas correlações não foram encontradas após a criopreservação, notando apenas correlações entre a motilidade e o total de espermatozóides corados por JC-1 (verdes + vermelhos). Observaram que menos do que 1% dos espermatozóides corados por JC-1 apresentou J-agregados após a criopreservação e descongelação. No entanto, estes autores não observaram diferenças ($P > 0,11$) no potencial de membrana de mitocôndrias de espermatozóides criopreservados de bovinos.

A adição do glicerol ao sêmen bovino mostrou uma diminuição do potencial de membrana, determinados pela diminuição da presença de J-agregados nos espermatozóides corados por JC-1 (GARNER et al., 1999).

Dois corantes fluorescentes foram recentemente desenvolvidos: cloreto de 8-(4'-clorometil) fenil-2,3,5,6,11,12,14,15 octahidro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino-8H-xantílio (CMXRos) e 8 - (4'-clorometil) fenil -2,3,5,6,11,12,14,15 octahidro -1H,4H,10H,13H - diquinolizino -8H -xanteno (H₂-CMXRos). O corante CMXRos é catiônico e fluorescente intrinsecamente, enquanto, o corante H₂-CMXRos reduzido se torna fluorescente somente após oxidado (POOT et al., 1996).

Ambos corantes CMXRos e H₂-CMXRos têm um grupo químico clorometil acoplado. Devido ao seu potencial de membrana, mitocôndrias funcionais absorvem estes corantes. Uma vez que as sondas estejam acumuladas na mitocôndria, o grupo clorometil pode reagir com nucleofílos acessíveis, incluindo grupos tiol de peptídeos e proteínas, para formar um conjugado fixável ao aldeído. A excitação máxima é obtida a 594 nm, enquanto a emissão máxima a 608 nm (POOT et al., 1996).

Poot et al. (1996) utilizaram microscopia de fluorescência e citometria de fluxo para caracterizar e comparar os corantes CMXRos e H₂-CMXRos com os corantes convencionais R123 e JC-1 em células NIH 3T3 de camundongos e células endoteliais da artéria pulmonar de bovinos. Em razão de CMXRos e H₂-CMXRos possuírem os grupos clorometil, os quais acredita-se formar ligações covalentes com proteínas tiol na mitocôndria, eles permaneceram retidos em células que foram fixadas com agentes de ligação protéica. Enquanto, o sinal de R123 foi perdido após fixação com formaldeído e permeabilização com acetona, a fluorescência das sondas CMXRos e H₂-CMXRos foi retida. A fluorescência de JC-1 foi preservada após a fixação da célula, entretanto, a fluorescência mudou para um comprimento de onda mais curto, o que pode refletir o colapso do potencial de membrana mitocondrial após a permeabilização da célula, pois resulta na mudança da emissão de JC-1 de vermelho para verde, por outro lado o tratamento com acetona estabiliza a fluorescência. Estes autores

notaram que o comportamento inexplicável da sonda JC-1 complica a interpretação dos resultados obtidos por células coradas por ele.

Células vivas coradas com CMXRos exibiram muito mais fluorescência fotoestável do que células coradas com R123. Todas as sondas mitocondriais testadas responderam a inibidores mitocondriais, sendo o CMXRos a sonda fluorescente mais sensível (POOT et al., 1996).

Em células espermáticas, a sonda CMXRos tem sido utilizada na avaliação do potencial de membrana de mitocôndria de espermatozóides humanos (WOJCIK et al., 2000).

Uma nova sonda mitocondrial, o MitoTracker green FM (MITO), não é fluorescente em soluções aquosas e se torna fluorescente quando acumulada no ambiente lipídico da mitocôndria. Os espectros de excitação e emissão máximos são 490 e 516 nm, respectivamente (HAUGLAND, 2001).

A sonda fluorescente MITO tem sido utilizada em espermatozóides humanos para visualizar displasias da bainha mitocondrial (RAWE et al., 2001) e em espermatozóides bovinos para verificar efeitos da criopreservação (GARNER et al., 1997).

Notadamente, o corante MITO parece acumular-se preferencialmente na mitocôndria, indiferente do potencial de membrana mitocondrial, tornando-o um instrumento para a possível determinação da massa mitocondrial (HAUGLAND, 2001). Contraditoriamente, em células espermáticas criopreservadas de bovinos, observou-se que a porcentagem de espermatozóides com mitocôndrias coradas pelo MITO foi altamente correlacionada com a porcentagem de motilidade espermática ($r = 0,96$) e viabilidade espermática detectada pelo uso do SYBR-14 ($r = 0,97$), indicando que esta sonda reflete o status funcional da mitocôndria (GARNER et al., 1997).

Garner et al. (1997) compararam MITO com mais duas sondas fluorescentes, específicas para mitocôndrias em sêmen criopreservado de bovinos, R123 e JC-1,

correlacionando-as com motilidade e viabilidade espermáticas. Os espermatozóides corados com JC-1 tiveram as mais altas proporções de mitocôndrias coradas ($59,0 \pm 7,4\%$), seguidas daquelas coradas por MITO ($50,4 \pm 7,3\%$) e R123 ($45,8 \pm 6,2\%$). As porcentagens médias da motilidade espermática estimada visualmente por microscopia óptica foram mais altas que as porcentagens médias das mitocôndrias coradas fluorescentemente com R123, JC-1 ou MITO. No entanto, as três sondas fluorescentes identificaram populações espermáticas que foram significativamente correlacionadas com a motilidade espermática ($r > 0,96$) e com a viabilidade espermática determinada por SYBR-14 ($r > 0,97$). A sonda JC-1 teve vantagem sobre as sondas R123 e MITO em diferenciar potencial de membrana mais alto e mais baixo, mas o significado desta diferenciação ainda deve ser determinado.

4.3.1.4 AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA DA CROMATINA ESPERMÁTICA

A integridade da cromatina é essencial para o desenvolvimento embrionário após a fertilização e união dos pró-núcleos feminino e masculino. Vários autores têm sugerido que espermatozóides que possuem núcleos irregulares apresentam cromatina com estrutura alterada e que essas alterações poderiam ser detectadas por padrões anormais de desnaturação do DNA em testes específicos (GLEDHILL et al., 1971; EVENSON et al., 1980; FRASER, 2004; ROUX et al., 2004).

O DNA de células de morfologia irregular é menos resistente à desnaturação térmica, todavia, muitos espermatozóides normais de doadores subférteis também são anormalmente susceptíveis à desnaturação térmica de seu DNA, sendo que a sensibilidade da cromatina ao estresse térmico pode ser um determinante adicional da fertilidade (EVENSON, 1980).

Dentre os compartimentos sobre os quais a criopreservação pode causar algum tipo de efeito negativo na célula espermática, o núcleo pode ser um elemento importante no

contexto, apesar de ser considerado como um elemento estável e menos afetado pela congelação e descongelação (HAMAMAH et al., 1990).

Queda na fertilidade de amostras de sêmen humano criopreservadas foram observadas e sugeridas como sendo em decorrência da maior condensação da cromatina (ROYERE et al., 1991). A criopreservação do sêmen bovino também pode causar alteração do DNA e diminuição da fertilidade (BOCHENEK et al., 2001; ANZAR et al., 2002; JANUSKAUSKAS et al., 2003).

A integridade do DNA de sêmen humano fresco foi comparada com sêmen congelado por quatro técnicas: rápida com e sem crioprotetor e lenta com e sem crioprotetor. O sêmen fresco apresentou alta correlação com o sêmen congelado rápido sem crioprotetor ($r = 0,88$), sendo que também apresentou alta correlação com sêmen congelado rápido com crioprotetor ($r = 0,74$) e lento sem crioprotetor ($r = 0,66$) e baixa correlação com congelado lento com crioprotetor ($r = 0,28$) (DUTY et al., 2002).

O sucesso da ampla utilização da inseminação artificial com sêmen congelado de bovinos, fornece indícios de que poucos danos no genoma haplóide do espermatozóide devem ocorrer (WATSON, 1995). Posteriores avanços têm mostrado que há uma maior contribuição do espermatozóide para o desenvolvimento do zigoto do que a de simples portador da metade do genoma, indicando assim, o surgimento da possibilidade do espermatozóide fornecer elementos importantes para a união genômica como é o caso de microtúbulos do centrossomo espermático (NAVARA et al., 1995). Isso implicaria efeitos mais delicados e, às vezes imperceptíveis, sobre esses elementos que podem de alguma forma ser afetados pela criopreservação (WATSON, 2000).

A fragmentação do DNA genômico do espermatozóide pode ocorrer por ativação de endonucleases ou mediado por proteínas da superfície celular (DONNELLY et al., 2000).

A quebra na fita de DNA pode ser detectada pela técnica de TUNEL (BACCETTI et al., 1999; DONNELLY et al., 2000), pelo ensaio Cometa, por gel de eletroforese (DONNELLY et al., 2000; DUTY et al., 2002) e pela técnica de “Feulgen”, na qual mudanças nucleares após a congelação, em espermatozóides suínos, são detectadas por diferenças na intensidade do corante (HAMAMAH et al., 1990). Ainda, a avaliação da estrutura da cromatina espermática tem sido realizada com o uso da acridina laranja, um corante fluorescente que se intercala à dupla fita de DNA e fluoresce em verde quando esta se apresenta íntegra, todavia, quando associada a uma porção desnaturada da fita de DNA, ou quando associada ao RNA, a acridina emite fluorescência laranja, permitindo a quantificação de desnaturação do DNA das células de uma amostra, podendo auxiliar na identificação de indivíduos portadores de distúrbios muito sensíveis ocorridos durante o processo da espermatogênese (FOSSA et al., 1997).

A coloração por acridina laranja foi desenvolvida para a avaliação de espermatozóides humanos (EVENSON et al., 1980; EVENSON, 1980; TEJADA et al., 1984) e adaptada para espermatozóides bovinos (UNANIAN, 2000). Este teste pode ser aplicado para controlar a qualidade do sêmen, para melhor compreender certos tipos de infertilidade masculina, para checar a condição do sêmen usado na fertilização *in vitro* e para diagnosticar indivíduos que apresentem espermiogramas normais e fertilidade reduzida (TEJADA et al., 1984). Assim, a avaliação da integridade da cromatina pelo uso da técnica da acridina laranja tem sido utilizada para avaliar sêmen criopreservado de bovinos (JANUSKAUSKAS et al., 2001; BOCHENEK et al., 2001; ANZAR et al., 2002; JANUSKAUSKAS et al., 2003).

Os efeitos da desnaturação do DNA foram avaliados, com acridina laranja, sobre espermatozóides criopreservados de bovino comparando quatro combinações de diluidores com gema de ovo e leite. As combinações testadas nas frações A e B dos diluidores foram: 1) leite e leite, 2) leite e gema de ovo, 3) gema de ovo e leite e 4) gema de ovo e gema de ovo.

Verificou-se maior percentual de espermatozóides com DNA desnaturado quando o diluidor continha leite em ambas as frações e seguido do diluidor com leite na fração A e gema de ovo na fração B (KARABINUS et al., 1991).

4.3.2 ASSOCIAÇÕES DE SONDAS FLUORESCENTES

A associação de sondas fluorescentes vem sendo preconizada para uma avaliação total das células presentes em uma amostra, como por exemplo, associação de PI com SYBR-14, na qual é possível observar células com membrana plasmática lesada, com núcleo corado em vermelho e as demais células, ou seja, aquelas com membrana plasmática intacta, com núcleo corado em verde. Esta associação permite a contagem total das células, separando uma população que apresenta membrana plasmática intacta e outra com membrana plasmática lesada (GARNER et al., 1986). Com o mesmo objetivo, outras associações vêm sendo realizadas e aplicadas, como a do PI com o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (HARRISON; VICKERS, 1990; COELHO et al., 1995; PEÑA et al., 1998) e a do PI com H342 (MAXWELL et al., 1997).

Ainda, as associações de sondas fluorescentes permitem avaliar simultaneamente mais do que um compartimento da célula espermática. Casey et al. (1993) validaram uma técnica de avaliação simultânea da membrana plasmática e do acrossomo pela associação de H258 e FITC-PSA para espermatozóides eqüinos. Souza (2001) utilizou esta técnica para avaliar espermatozóides criopreservados de eqüinos. Thomas et al. (1997), para analisar espermatozóide bovino, associaram PI e LYSO-G ou PI + SYTO-17 e FITC-PNA, para avaliar integridade de membrana plasmática e acrossomal, respectivamente. De Leeuw et al. (1991) avaliaram integridade da membrana plasmática com H258 e lesão de acrossomo por microscopia de contraste de fase.

A avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal pela associação de PI e FITC-PSA foi realizada em espermatozóides humanos (CENTOLA et al., 1990), ovinos (SUKARDI et al., 1997), eqüinos (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003a) e bovinos (GRAHAM et al., 1990; WAY et al., 1995).

Uma combinação de três sondas fluorescentes foi desenvolvida para analisar amostras de espermatozóides criopreservados em diluidor à base de gema de ovo quanto a integridade das membranas plasmática e acrossomal. A técnica associa PNA conjugado a ficoeritrina (PE), que cora espermatozóides lesados, às sondas SYBR-14 e PI, que marcam células com membrana plasmática intacta e lesada, respectivamente, sendo a leitura realizada por um sistema de citometria de fluxo (NAGY et al., 2003).

Poot et al. (1996) associaram as sondas CMXRos, 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) e BODIPY FL conjugado com anticorpo secundário em células NIH 3T3 de ratos, para avaliar função mitocondrial e identificar e localizar o núcleo e os microtúbulos, respectivamente. Esta associação resultou em mitocôndrias coradas de vermelho pelo CMXRos, o núcleo preenchido de azul pelo corante DAPI e a rede de microtúbulos celulares corados de verde pelo BODIPY FL conjugado com anticorpo secundário. Cada alvo foi avaliado distintamente por microscopia de fluorescência. Baccetti et al. (1999) avaliaram simultaneamente apoptose, danos acrossomais e estruturas axonemais em humanos inférteis também por uma técnica de imunofluorescência.

Thomas et al. (1998) avaliaram os efeitos da criopreservação sobre diferentes compartimentos dos espermatozóides bovinos utilizando três sondas diferentes específicas para cada organela. Utilizaram o SYBR-14, que cora o núcleo dos espermatozóides com plasmalema íntegro de verde, o LYSO-G foi utilizado para verificar integridade de acrossomo, corando os acrossomos íntegros de verde claro e o JC-1 foi utilizado para verificar a função mitocondrial.

Os efeitos do glicerol foram testados sobre espermatozóides bovinos resfriados a 5° C por 24 horas pela associação de sondas. A associação de SYBR-14 e PI foi usada para avaliar efeitos do glicerol sobre a membrana plasmática; enquanto JC-1, SYBR-14 e PI foram associados para avaliar o potencial de membrana mitocondrial e FITC-PNA e SYTO-17 para avaliar o status acrossomal. Foi observado que o glicerol não afetou a membrana plasmática, além de mostrar efeito protetor sobre o acrossomo, mas diminuiu a proporção de espermatozóides na amostra que exibiram alto potencial de membrana mitocondrial (GARNER et al., 1999).

Graham et al. (1990) demonstraram que pelo menos três compartimentos do espermatozóide bovino podem ser avaliados, simultaneamente, pela adição de três sondas, sendo uma para integridade de membrana plasmática, uma para integridade de acrossomo e outra para função mitocondrial. Utilizaram PI para avaliação da integridade da membrana plasmática, PSA para determinar a integridade do acrossomo e R123 para verificar função mitocondrial. Para esta avaliação simultânea os autores dispuseram de um sistema de citometria de fluxo e as validações foram realizadas separadamente para cada sonda.

De acordo com Tartaglione e Ritta (2004) quanto mais parâmetros espermáticos são avaliados em uma amostra de sêmen bovino criopreservado, maior será o valor no prognóstico da fertilidade *in vitro*.

Uma técnica de avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, que forneça informações mais precisas e acuradas sobre a qualidade seminal é de extrema importância (ARRUDA et al., 2004). Contudo, numa central de biotecnologia de sêmen, um grande número de amostras deve ser processado e avaliado. Desta forma, esta técnica deve apresentar menor dispêndio de tempo e de custo para que sua aplicação seja rotineira.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL

As atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Biotecnologias do Sêmen e Andrologia, no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no Campus Administrativo de Pirassununga. O período experimental estendeu-se de janeiro de 2002 até fevereiro de 2005.

5.2 ANIMAIS E MANEJO

Foram utilizados 16 touros puros da raça Simental (figura 1) com idade entre 3 e 4 anos, mantidos sob as mesmas condições ambientais, ou seja, em pastagem de capim-Braquiária (*Brachiaria decumbens*, Stapf), com água e sal mineral *ad libitum* e suplementação concentrada diária, segundo exigências estabelecidas pelo NRC (2001). Os animais foram pesados quinzenalmente e realizados os controles de endo e ectoparasitas regularmente.

5.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Baseados nos objetivos deste trabalho foram delineados dois experimentos, sendo o primeiro para o desenvolvimento de uma técnica de avaliação simultânea das membranas

plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides bovinos pela associação de sondas fluorescentes e o segundo para a avaliação dos efeitos da criopreservação do sêmen bovino com dois diluidores (Bioxcell[®] - IMV Technologies, IVP do Brasil e Botu-Bov[®] - [®] Biotech-Botucatu-Ltda/ME) utilizando a técnica de associação de sondas fluorescentes desenvolvida no primeiro experimento.

Figura 1 – Touros da raça Simental utilizados para a experimentação - Pirassununga - 2005

5.4 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO SIMULTÂNEA DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCONDRIAL DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS PELA ASSOCIAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES

Este experimento foi delineado com o objetivo de desenvolver uma técnica de avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides bovinos de fácil execução e que apresente repetibilidade de seus resultados. Para isso, foram realizados alguns testes para a determinação de protocolos de associações de sondas, seguido da validação dos protocolos. Foi realizado durante o período de janeiro de 2002 a setembro de 2004.

5.4.1 TESTES PRELIMINARES

Foram realizados vários testes para a determinação de protocolos mais adequados e eficientes de associação de sondas fluorescentes para a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial para espermatozóides frescos e criopreservados de bovinos. Para tais testes foram utilizadas diferentes concentrações espermáticas e meios de diluição, além de variados tipos e concentrações de sondas fluorescentes.

Os meios de diluição do sêmen testados foram TALP *sperm* (BAVISTER et al., 1983) (Anexo 1) e HEPES-BSA (THOMAS et al., 1998) (Anexo 2), considerando tanto a preservação das células espermáticas quanto a visualização da fluorescência emitida pelas sondas. Logo após a diluição, as amostras foram avaliadas quanto a motilidade e o vigor espermático. Estas avaliações foram repetidas depois de 30 minutos de incubação *in vitro*, em banho-Maria a 37°C.

Também foram testadas as concentrações de 25 e 50 milhões de espermatozóides por mililitro e os volumes de sêmen diluído: 150 μ L, 200 μ L, 300 μ L e 400 μ L.

Para verificar a integridade da membrana plasmática foram utilizadas as sondas fluorescentes iodeto de propídio (PI; Sigma, 28,707-5), SYBR-14 (Molecular Probes, LIVE/DEAD Sperm Viability kit, L-7011) e Hoechst 33342 (H342; Molecular Probes, H-1399).

A sonda fluorescente testada para verificar a integridade do acrossomo foi a aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, Sigma, L-0770), nos volumes de 50 e 100 μ L de FITC-PSA (100 μ g/mL).

Para a avaliação da função mitocondrial foram testadas as sondas: Rodamina 123 (R123, Molecular Probes, R-302), MitoTracker green FM (MITO, Molecular Probes, M-7514), CMXRos (MitoTracker red, Molecular Probes, M-7512) e JC-1 (Molecular Probes, T-3168), em diferentes concentrações.

Baseados nos testes previamente realizados e citações literárias, as sondas fluorescentes foram associadas. A associação das sondas PI e FITC-PSA, já está bem estabelecida para a avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomo, respectivamente. Todavia, as sondas para avaliação da função mitocondrial passíveis de serem associadas ao PI e FITC-PSA foram testadas e validadas, a partir de quatro protocolos diferentes, que foram estabelecidos com base nos testes iniciais, cada um utilizando uma sonda fluorescente diferente para a função mitocondrial:

PROTOCOLO 1: Associação de PI, FITC-PSA e Rodamina 123

PROTOCOLO 2: Associação de PI, FITC-PSA e Mito Tracker Green FM

PROTOCOLO 3: Associação de PI, H342, FITC-PSA e CMXRos (Mito Tracker Red)

PROTOCOLO 4: Associação de PI, H342, FITC-PSA e JC-1

5.4.2 COLHEITA DO SÊMEN

As colheitas de sêmen dos touros foram realizadas por eletroejaculação, sendo realizada higienização do prepúcio antes de cada colheita, externamente com água e sabão neutro e internamente com solução fisiológica, para evitar possíveis contaminações do sêmen.

5.4.3 AVALIAÇÕES DO SÊMEN

Logo após a colheita, cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor e alterações morfológicas. Todo o material utilizado na colheita e avaliação do sêmen foi mantido aquecido, na temperatura de 37°C, para evitar choque térmico e alterações das características seminais.

O volume foi averiguado pela leitura direta do tubo de colheita graduado com fração de 0,1 mL. A concentração foi realizada diluindo-se o sêmen, na proporção de 1:100, em formol salino tamponado e as células espermáticas contadas em câmara de Neubauer em microscopia óptica com aumento de 400 x.

A motilidade e o vigor foram avaliados em uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, em aumento de 100 x; a motilidade foi expressa em porcentagem de espermatozóides móveis; enquanto, o vigor, referente à velocidade progressiva uniforme das células em movimento, foi classificado em escores de 1 a 5, sendo o escore 1 o mais lento e aumentando gradativamente até o escore 5, correspondendo ao mais rápido movimento progressivo uniforme.

Para avaliar as alterações morfológicas, o sêmen foi diluído em formol salino tamponado e a leitura realizada em preparações úmidas, sob microscopia de contraste de fase

(Zeiss, modelo ICS-standard 25) com aumento de 1.000 x, contando-se 200 células por amostra, anotando-se as alterações observadas.

5.4.4 VALIDAÇÃO DOS PROTOCOLOS PARA AVALIAÇÃO SIMULTÂNEA DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL E FUNÇÃO MITOCONDRIAL

Para a validação dos protocolos de associação de sondas fluorescentes foram utilizadas três colheitas de sêmen de quatro touros da raça Simental ($n = 12$). Os touros utilizados foram selecionados dos 16 animais disponíveis para a experimentação, sendo utilizados apenas ejaculados apresentando motilidade $\geq 80\%$, vigor ≥ 3 e alterações morfológicas $\leq 10\%$.

Após as análises, o sêmen foi diluído em meio TALP *sperm* (Anexo 1), na concentração de 25×10^6 espermatozóides/mL, e dividido em duas alíquotas, sendo que uma das alíquotas foi mantida viável e a outra foi submetida à congelação rápida em nitrogênio líquido seguida de descongelação lenta (*flash frozen*) por três vezes consecutivas, causando injúrias às membranas celulares e danos na função mitocondrial, seguindo um protocolo adaptado de Arruda (2000). Três tratamentos foram preparados a partir destas alíquotas, com as seguintes proporções de Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*: 100:0 (T100), 50:50 (T50) e 0:100 (T0), como ilustrado no esquema da figura 2.

Figura 2 - Esquema para o preparo do sêmen em três tratamentos, de acordo com a proporção de Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen* (T100, T50 e T0) - Pirassununga - 2002

Após o preparo, as três amostras (T100, T50 e T0) foram submetidas aos protocolos de associações de sondas, como descrito a seguir:

PROTOCOLO 1:

Associação de PI, FITC-PSA e Rodamina 123

- Colocar 150 µL de sêmen diluído em TALP (25×10^6 spz/mL) em um microtubo.
- Adicionar 2 µL de PI (2 mg/mL em DPBS).
- Adicionar 2 µL de R123 (0,53 mM em DMSO).
- Adicionar 50 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS).
- Incubar por 30 minutos a 37° C.

PROTOCOLO 2:

Associação de PI, FITC-PSA e Mito Tracker Green FM

- Colocar 150 µL de sêmen diluído em TALP (25×10^6 spz/mL) em um microtubo.
- Adicionar 2 µL de PI (2 mg/mL em DPBS).
- Adicionar 2 µL de MITO (1 mM em DMSO).
- Adicionar 50 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS).
- Incubar por 8 minutos a 38,5° C.

PROTOCOLO 3:***Associação de PI, H342, FITC-PSA e CMXRos (Mito Tracker Red)***

- Colocar 150 µL de sêmen diluído em TALP (25×10^6 spz/mL) em um microtubo.
- Adicionar 2 µL de Hoechst 33342 (40 µg/mL em DPBS).
- Incubar por 10 minutos a 37° C.
- Adicionar 3 µL de PI (0,5 mg/mL em DPBS).
- Adicionar 0,5 µL de CMXRos (500 µM em DMSO).
- Adicionar 50 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS).
- Incubar por 8 minutos a 38,5° C.

PROTOCOLO 4:***Associação de PI, H342, FITC-PSA e JC-1***

- Colocar 150 µL de sêmen diluído em TALP (25×10^6 spz/mL) em um microtubo.
- Adicionar 2 µL de Hoechst 33342 (40 µg/mL em DPBS).
- Incubar por 10 minutos a 37° C.
- Adicionar 3 µL de PI (0,5 mg/mL em DPBS).
- Adicionar 2 µL de JC-1 (153 µM em DMSO).
- Adicionar 50 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS).
- Incubar por 8 minutos a 37° C.

Após o preparo de cada protocolo, uma preparação úmida foi realizada entre lâmina e lamínula e 200 espermatozóides foram avaliados imediatamente em aumento de 1.000 x em microscopia de epifluorescência e classificados quanto ao padrão de coloração.

A leitura foi realizada em microscopia de epifluorescência (marca Zeiss, mod. Axioplan-2, Germany), localizado no Laboratório de Morfologia Molecular e Desenvolvimento (Departamento de Ciências Básicas - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo), em filtro com excitação de 400-570 nm e emissão de 460-610 nm (filtro 25) para os protocolos 1 e 2 e em filtro com excitação de 365 nm e

emissão de 420 nm (filtro 02) para os protocolos 3 e 4, sendo necessário, algumas vezes checar a fluorescência no filtro 25.

Uma descrição mais detalhada da diluição das sondas fluorescentes é apresentada no Anexo 3.

5.4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Este experimento foi delineado com três tratamentos: T100, T50 e T0. As variáveis analisadas foram: integridade de membrana plasmática, verificada pela exclusão do PI e/ou inclusão do H342, lesão de acrossomo, detectada pela coloração pelo FITC-PSA e função mitocondrial, determinada pelo MITO, CMXRos ou JC-1.

As porcentagens de integridade de membrana plasmática, acrossomo e função mitocondrial foram comparadas entre os tratamentos T100, T50 e T0 por análise de variância (ANOVA), quando detectado efeito do tratamento as médias foram comparadas pelo teste de *Fisher* (StatView SAS Institute, Cary, NC, USA, 1998).

Quando constatada diferença estatística entre os tratamentos, por ANOVA, em um nível de significância de 5%, os dados obtidos de integridade de membrana plasmática, lesão de acrossomo e função mitocondrial (variáveis dependentes) nos tratamentos T100, T50 e T0 (variáveis independentes) foram submetidos à análise de regressão linear utilizando-se o programa StatView (SAS Institute, Cary, NC, USA, 1998), a fim de verificar a eficiência das sondas para a detecção de lesão de membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial.

5.2 EXPERIMENTO 2: EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO SOBRE AS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL, MITOCONDRIAL E ESTRUTURA DA CROMATINA PELA UTILIZAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES

Este experimento foi realizado durante o período de setembro de 2004 a fevereiro de 2005, sendo utilizados oito dos 16 touros da raça Simental disponíveis para a experimentação, sendo selecionados aqueles que apresentaram melhores características seminais. Este experimento consistiu na colheita do sêmen dos touros, análise do sêmen pré-criopreservação, criopreservação do sêmen com dois diluidores diferentes (Bioxcell[®] e Botu-Bov[®]) e descongelação e análise do sêmen pós-criopreservação, como esquematizado na figura 3.

Figura 3 - Esquema simplificado dos procedimentos realizados no experimento 2 - Pirassununga -2005

5.2.1 COLHEITA DO SÊMEN

Foram realizadas sete colheitas de sêmen de cada touro (8 touros x 7 colheitas, n=56) com intervalos semanais, utilizando-se eletroejaculador.

5.2.2 AVALIAÇÕES DO SÊMEN PRÉ-CRIOPRESERVAÇÃO

Logo após a colheita o sêmen foi avaliado quanto ao volume, concentração espermática, motilidade e vigor visual, motilidade espermática por sistema computadorizado (CASA – computer-assisted semen analysis), alterações morfológicas, integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial e integridade da cromatina.

5.2.2.1 VOLUME

O volume foi determinado pela leitura direta no tubo de colheita graduado de 15 mL com fração de 0,1 mL.

5.2.2.2 CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

Para a concentração espermática o sêmen foi diluído na proporção de 1:100, ou seja, 10 µL de sêmen: 990 µL de formol salino tamponado. A leitura foi realizada em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica comum em aumento de 400 x.

5.2.2.3 MOTILIDADE E VIGOR

A motilidade e o vigor foram avaliados em uma gota de sêmen *in natura* entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas, 37°C) sob microscopia de contraste de fase em aumento de 100x. A motilidade foi dada pela estimativa visual da porcentagem de células em movimento, enquanto, o vigor foi referente à velocidade progressiva uniforme das células em movimento, classificado em escores de 1 a 5, sendo o escore 1 o mais lento e aumentando gradativamente até o escore 5 correspondendo ao mais rápido movimento progressivo uniforme.

5.2.2.4 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA

Para a avaliação da motilidade espermática pelo sistema computadorizado (CASA) uma amostra do sêmen foi diluída em meio TALP *sperm* (Anexo 1), na concentração de 25×10^6 espermatozóides/mL, mantida por 5 minutos, tempo para interação do diluidor com o sêmen. Dois microlitros desta amostra foram colocados na câmara de leitura (Leja[®] standard count, SC20.01.FA, 20 micron), a qual foi inserida no aparelho modelo Ivos-Ultimate da Hamilton Thorne Biosciences, que captura a imagem da amostra por um microscópio acoplado a um computador e envia os dados para um programa computacional responsável por realizar a análise, sendo previamente ajustado (*setup*) para a análise de sêmen bovino (conforme Anexo 4). No mínimo 12 campos foram selecionados para a leitura e análise, buscando sempre os melhores campos.

As características analisadas foram: 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, %); cujas definições foram descritas por Arruda (2000).

5.2.2.5 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS ESPERMATOZÓIDES

As avaliações das características morfológicas dos espermatozóides foram realizadas pela técnica da câmara úmida. Para isso, o sêmen foi diluído e fixado em formol salino tamponado, previamente aquecido (37° C), foi preparada uma câmara úmida, com uma gota do sêmen diluído entre lâmina e lamínula e a avaliação foi realizada pela contagem de 200 células em aumento de 1.000 x sob microscopia de interferência diferencial (Nikon, modelo 80i).

5.2.2.6 AVALIAÇÃO DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCONDRIAL

A integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial foram avaliadas pela associação das sondas PI, FITC-PSA e JC-1, seguindo o protocolo 4 do experimento 1, sem a adição do H342. Para esta análise foram colocados em um microtubo 150 µL de uma amostra do sêmen diluído em meio TALP *sperm*, na concentração de 25×10^6 espermatozóides/mL, adicionados 3 µL de PI (0,5 mg/mL em DPBS), 2 µL de JC-1 (153 µM em DMSO) e 50 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS). A amostra foi incubada por 8 minutos a 37° C. Após a incubação uma gota (7 µL) desta foi utilizada para o preparo da câmara úmida, entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37° C) e a leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência marca Nikon, Modelo Eclipse 80i) em um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C

(excitação 340-380 nm e emissão 435-485), B-2E/C (excitação 465-495 e emissão 515-555) e G-2E/C (excitação 540-525 e emissão 605-655), com aumento de 1.000 x.

As células foram classificadas em oito categorias de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, conforme os resultados do experimento 1 (quadro 1).

Quadro 1 – Classificação das células em categorias de acordo com a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial, detectadas pelas sondas PI, FITC-PSA e JC-1, respectivamente, Pirassununga - 2005

ORDEM	CATEGORIA	SIGLA
1	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Intacto e Com Função Mitocondrial	PIAIC
2	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Intacto e Sem Função Mitocondrial	PIAIS
3	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Lesado e Com Função Mitocondrial	PIALC
4	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Lesado e Sem Função Mitocondrial	PIALS
5	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Intacto e Com Função Mitocondrial	PLAIC
6	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Intacto e Sem Função Mitocondrial	PLAIS
7	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Lesado e Com Função Mitocondrial	PLALC
8	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Lesado e Sem Função Mitocondrial	PLALS

5.2.2.7 ANÁLISE DA ESTRUTURA DA CROMATINA ESPERMÁTICA

A análise da estrutura da cromatina foi realizada pela técnica descrita por Tejada et al. (1984) e modificada por Unanian (2000), utilizando o corante fluorescente laranja de acridina, um corante metacromático de DNA que permite a detecção da fragmentação do DNA por código de cor.

Um mililitro do sêmen *in natura* foi centrifugado ($3.000 \times g$ por 5 minutos) e o sobrenadante retirado, sendo que essa operação foi repetida por 3 vezes, de forma a obter sobrenadante límpido. O sedimento foi re-suspenso em água destilada, para uma concentração de 50×10^6 espermatozóides/mL. Um esfregaço foi preparado com uma gota ($7 \mu\text{L}$) desta solução e deixado secar em temperatura ambiente por 60 minutos. O esfregaço foi imerso em Solução de Carnoy (3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético) para a fixação durante 12 horas. A lâmina foi seca à temperatura ambiente e posteriormente coberta com 3 mL da solução de acridina laranja (10 mL de solução de acridina laranja $1 \mu\text{g/mL}$ + 40 mL de solução de ácido cítrico 0,1 M + 2,5 mL de solução de fosfato dissódico 0,3 M; pH: 2 - 3), de modo a permanecer corando por 5 minutos em ambiente escuro. O esfregaço foi lavado cuidadosamente em água destilada e antes de secar foi coberto por uma lamínula (24 x 60 mm). A lâmina foi examinada em microscópio de epifluorescência (Marca Nikon, Modelo Eclipse 80i) com filtro (B-2E/C) com excitação de 465-495 nm e emissão de 515-555 nm, com aumento de 600 x. Para cada esfregaço foram contadas 500 células e classificadas de acordo com Tejada et al. (1984), sendo que as células que emitiram fluorescência verde foram consideradas normais, ou seja, com cromatina íntegra, enquanto, as células que emitiram fluorescência vermelha, laranja, amarela ou seus subtons distribuídos de forma regular ou irregular no interior da cabeça foram consideradas anormais, pois denotam desnaturação total ou parcial da cromatina.

5.2.3 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

Cada ejaculado foi diluído nos meios Bioxcell[®] (IMV Technologies, IVP do Brasil, Anexo 5) e Botu-Bov[®] (© Biotech-Botucatu-Ltda/ME, Anexo 6) na concentração de 100×10^6 espermatozóides/mL. Após a diluição, o sêmen foi mantido por 10 minutos em

banho-Maria a 37°C para estabilização, conforme indicação dos fabricantes. Após esse período o sêmen foi homogeneizado e foram envasadas 10 palhetas francesas de 0,5 mL do sêmen diluído com cada meio, as quais foram cuidadosamente identificadas com o nome do touro, a partida do ejaculado e o diluidor utilizado.

A criopreservação do sêmen foi realizada utilizando um sistema programável de criopreservação do sêmen portátil (Tetakon, TK 3000) composto por um aparelho programável, equipado com um porta-palhetas, um tubo de resfriamento e uma caixa térmica para nitrogênio líquido (figura 4).

Para o resfriamento as palhetas foram colocadas no porta-palhetas, o qual foi acondicionado ao tubo de resfriamento, permanecendo até alcançar 5°C, seguindo uma curva de resfriamento de 0,25°C/minuto, com duração em torno de 1 hora e 15 minutos. Ao atingir 5°C o porta-palhetas foi removido para a caixa térmica contendo nitrogênio líquido, na qual a curva de congelação foi procedida com uma taxa de -15°C/minuto de 5°C até -80°C, após alcançar essa temperatura, a taxa passou a ser de -10°C/minuto até -120°C. A curva de congelação durou, em média, 7 minutos, quando as palhetas foram removidas do porta-palhetas e imersas em nitrogênio líquido (-196°C). Por fim, as palhetas foram raqueadas e armazenadas em botijões criogênicos.

Figura 4 – Sistema programável para criopreservação de sêmen (Tetakon, TK-3000). 1. aparelho programável, 2. Tubo de resfriamento adaptado com porta-palhetas e 3. Caixa térmica para nitrogênio líquido - Pirassununga -2005

5.2.4 AVALIAÇÕES DO SÊMEN PÓS-CRIOPRESERVAÇÃO

Duas palhetas de sêmen de cada tratamento (diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®]) de uma mesma partida foram descongeladas (37^o C por 30 segundos), o sêmen foi colocado em um microtubo, homogeneizado e analisado quanto a motilidade e vigor visual, motilidade espermática por sistema computadorizado (CASA), alterações das características morfológicas, integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial e estrutura da cromatina.

5.2.4.1 MOTILIDADE E VIGOR

A motilidade e o vigor de cada amostra foram avaliados imediatamente após a descongelação, como descrito anteriormente para o sêmen fresco.

5.2.4.2 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA

A avaliação da motilidade espermática pelo sistema computadorizado (CASA) do sêmen pós-descongelação foi realizada com uma gota de sêmen (4 μ L) entre lâmina e lamínula (sem diluição em meio TALP), submetida ao aparelho modelo Ivos-Ultimate da Hamilton Thorne Biosciences, com os mesmos ajustes de *setup* realizado para o sêmen fresco (Anexo 4), considerando-se as mesmas características analisadas para o sêmen fresco (motilidade total, motilidade progressiva, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR e LIN).

5.2.4.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS ESPERMATOZÓIDES

A avaliação das características morfológicas dos espermatozóides foram realizadas da mesma forma descrita para o sêmen fresco.

5.2.4.4 AVALIAÇÃO DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCONDRIAL

A avaliação das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, foi realizada pela associação das sondas PI, FITC-PSA e JC-1, com algumas alterações no protocolo de coloração, devido a presença do diluidor, como descrito a seguir.

Uma amostra de 200 μL de sêmen pós-descongelado foi adicionada em 1.000 μL de meio TALP sperm. Uma amostra de 150 μL desta solução foi colocada em um microtubo e adicionados 3 μL de PI (0,5 mg/mL em PBS), 6 μL de JC-1 (153 μM em DMSO) e 50 μL de FITC-PSA (100 $\mu\text{g/mL}$ em DPBS). A amostra foi incubada por 8 minutos a 37° C. Após a incubação uma gota (7 μL) desta foi utilizada para o preparo da câmara úmida, entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37° C) e a leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência marca Nikon, Modelo Eclipse 80i) em um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485), B-2E/C (excitação 465-495 e emissão 515-555) e G-2E/C (excitação 540-525 e emissão 605-655), com aumento de 1.000 x. As células foram classificadas nas oito categorias de acordo com a fluorescência emitida, conforme descrito no quadro 4.

5.2.4.5 ANÁLISE DA ESTRUTURA DA CROMATINA ESPERMÁTICA

Para a análise da estrutura da cromatina foram retirados 300 μL de sêmen descongelado e seguindo a técnica descrita por Tejada et al. (1984) e modificada por Unanian (2000).

5.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). As variáveis dependentes que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidas à transformação logarítmica $[\text{Log} (X+1)]$ ou pela raiz quadrada $[\text{RQ}(X+1/2)]$. Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à

Análise de Variância que separou como causas de variação o efeito de tratamento e efeito de bloco, formado em função do touro. Na presença de efeito de tratamento significativo, os tratamentos (sêmen fresco, criopreservado com Bioxcell® e criopreservado com Botu-Bov®) foram separados através do teste de Tukey. Foram calculadas correlações lineares de Pearson entre motilidade, integridade de membrana plasmática e função mitocondrial. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi 5%.

O quadro de análise de variância é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Quadro de Análise de Variância para delineamento em blocos com 3 tratamentos - Pirassununga - 2005

Causa de Variação	Grau de Liberdade
Tratamento	2
Bloco	7
Resíduo	158
Total	167

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos nos experimentos 1 e 2 estão descritos separadamente a seguir.

6.1 EXPERIMENTO 1: ASSOCIAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES PARA AVALIAÇÃO SIMULTÂNEA DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCONDRIAL EM ESPERMATOZÓIDES BOVINOS

Com base nos protocolos estabelecidos pelos testes preliminares, os resultados obtidos estão apresentados separadamente conforme descrito abaixo.

PROTOCOLO 1:

Associação de PI, FITC-PSA e Rodamina 123

A R123, quando associada às sondas PI e FITC-PSA, emitiu pouca fluorescência e com um padrão variável, ficando dúvidas na sua leitura. Desta forma, a leitura sob microscopia de epifluorescência deste protocolo não foi possível ser realizada com confiabilidade nos diferentes tratamentos, não sendo este protocolo, portanto, validado.

PROTOCOLO 2:***Associação de PI, FITC-PSA e Mito Tracker Green FM***

Este protocolo, em que foram associadas as sondas PI, FITC-PSA e MITO, permitiu a classificação das células espermáticas, de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, em oito categorias conforme descrito no quadro 2. A coloração espermática obtida na associação de PI, FITC-PSA e MITO pode ser visualizada na figura 5.

Quadro 2 – Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de PI, FITC-PSA e MITO - Pirassununga - 2002

CÉLULA ESPERMÁTICA	PI	FITC-PSA	MITO
Membrana plasmática intacta, com acrossomo intacto e com potencial de membrana mitocondrial	-	-	+
Membrana plasmática intacta, com acrossomo intacto e sem potencial de membrana mitocondrial	-	-	-
Membrana plasmática intacta, com acrossomo lesado e com potencial de membrana mitocondrial	-	+	+
Membrana plasmática intacta, com acrossomo lesado e sem potencial de membrana mitocondrial	-	+	-
Membrana plasmática lesada, com acrossomo intacto e com potencial de membrana mitocondrial	+	-	+
Membrana plasmática lesada, com acrossomo intacto e sem potencial de membrana mitocondrial	+	-	-
Membrana plasmática lesada, com acrossomo lesado e com potencial de membrana mitocondrial	+	+	+
Membrana plasmática lesada, com acrossomo lesado e sem potencial de membrana mitocondrial	+	+	-

OBS: PI positivo (+) = núcleo corado de vermelho
FITC-PSA positivo (+) = região do acrossomo verde-amarelada
MITO positivo (+) = região da peça intermediária corada em verde mais brilhante

Figura 5 - Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e MITO (aumento 1.000 x). **A.** Células com membrana plasmática intacta e acrossomo intacto, uma sem função mitocondrial (superior) e outra com função mitocondrial (inferior). **B.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado, com função mitocondrial. **C.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado, sem função mitocondrial. **D.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, sem função mitocondrial. **E.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, com função mitocondrial. **F.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, sem função mitocondrial - Pirassununga -2002

Foram observados efeitos significativos (ANOVA, $P < 0,0001$) entre os tratamentos T100, T50 e T0 para as porcentagens médias de espermatozóides apresentando integridade de membrana plasmática, integridade de acrossomo e função mitocondrial, sendo que os tratamentos diferiram significativamente (teste de *Fisher*, $P < 0,0001$) entre eles, como apresentado na tabela 2.

A partir destes resultados foi possível submeter os resultados encontrados a análise de regressão linear. Os diferentes tratamentos (T100, T50 e T0) no sêmen permitiram traçar retas de regressão para as características espermáticas avaliadas por cada sonda.

Para integridade de membrana plasmática, determinada pela sonda PI, neste protocolo, foi observada a reta de regressão mostrada na figura 6, representada pela equação: $\hat{Y} = 0,40 + 0,79 X$, na qual foi encontrado alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,95$).

A equação para acrossomo íntegro, detectada pela sonda FITC-PSA neste protocolo (PI/FITC-PSA/MITO) foi: $\hat{Y} = 8,51 + 0,81 X$ e o coeficiente de determinação: $R^2 = 0,95$, como apresentada na figura 7.

O potencial de membrana mitocondrial, detectado pelo MITO foi estimado pela equação: $\hat{Y} = 35,0 + 0,55 X$ e apresentou coeficiente de determinação de $R^2 = 0,84$, apresentados na figura 8.

Tabela 2 - Médias $\pm$ desvios padrão (%) de integridade da membrana plasmática, integridade do acrossomo e função mitocondrial obtidas no protocolo PI/FITC-PSA/MITO entre os tratamentos T0, T50 e T100 - Pirassununga -2002

Tratamento	Membrana Plasmática Intacta	Acrossomo Intacto	Função Mitocondrial
T0	$0,88 \pm 1,44^a$	$8,38 \pm 5,98^a$	$33,76 \pm 12,96^a$
T50	$38,84 \pm 10,64^b$	$49,42 \pm 11,11^b$	$65,03 \pm 10,68^b$
T100	$79,69 \pm 7,11^c$	$89,69 \pm 6,25^c$	$88,92 \pm 4,33^c$

Letras diferentes dentro da mesma coluna representam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,0001$)

T0 – Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100

T50 – Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50

T100 – Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0

Figura 6 - Integridade de membrana plasmática, verificada pela exclusão do iodeto de propídio no protocolo PI/FITC-PSA/MITO, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0) - Pirassununga -2002

Figura 7 - Acrossomo íntegro, detectado pelo FITC-PSA no protocolo PI/FITC-PSA/MITO, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0) - Pirassununga -2002

Figura 8 - Função mitocondrial, verificada pelo MitoTracker Green FM, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0) - Pirassununga -2002

PROTOCOLO 3:***Associação de PI, H342, FITC-PSA e CMXRos (Mito Tracker Red)***

O quadro 3 apresenta a classificação das células espermáticas, de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, neste protocolo. A coloração espermática obtida na associação de PI, H342, FITC-PSA e CMXRos pode ser visualizada na figura 9.

Quadro 3 – Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de PI, H342, FITC-PSA e CMXRos - Pirassununga -2004

CÉLULA ESPERMÁTICA	H342	PI	FITC-PSA	CMXRos
Membrana plasmática intacta, com acrossomo intacto e com potencial de membrana mitocondrial	+	-	-	+
Membrana plasmática intacta, com acrossomo intacto e sem potencial de membrana mitocondrial	+	-	-	-
Membrana plasmática intacta, com acrossomo lesado e com potencial de membrana mitocondrial	+	-	+	+
Membrana plasmática intacta, com acrossomo lesado e sem potencial de membrana mitocondrial	+	-	+	-
Membrana plasmática lesada, com acrossomo intacto e com potencial de membrana mitocondrial	—	+	-	+
Membrana plasmática lesada, com acrossomo intacto e sem potencial de membrana mitocondrial	—	+	-	-
Membrana plasmática lesada, com acrossomo lesado e com potencial de membrana mitocondrial	—	+	+	+
Membrana plasmática lesada, com acrossomo lesado e sem potencial de membrana mitocondrial	—	+	+	-

OBS: H342 positivo (+) = núcleo corado em azul
 PI positivo (+) = núcleo corado em vermelho
 FITC-PSA positivo (+) = região do acrossomo verde-amarelada
 CMXRos positivo (+) = região da peça intermediária corada em vermelho

Figura 9 - Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI, H342, FITC-PSA e CMXRos (aumento 1.000 x). **A.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto, com função mitocondrial. **B.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto, sem função mitocondrial. **C.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado, sem função mitocondrial. **D.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, sem função mitocondrial. **E.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, com função mitocondrial. **F.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, sem função mitocondrial - Pirassununga -2004

Pela ANOVA foram observados efeitos significativos ($P < 0,0001$) entre os tratamentos T0, T50 e T100 para as porcentagens médias de espermatozóides apresentando integridade de membrana plasmática, integridade de acrossomo e função mitocondrial, sendo que os tratamentos diferiram significativamente ($P < 0,0001$) entre si pelo teste de *Fisher*, como apresentado na tabela 3.

Partindo da afirmação que os tratamentos foram diferentes, os resultados foram submetidos à análise de regressão linear. Os diferentes tratamentos (T0, T50 e T100) no sêmen permitiram traçar retas de regressão para as características espermáticas avaliadas por cada sonda.

Neste protocolo (PI/H342/FITC-PSA/CMXRos) a integridade de membrana plasmática, determinada pelas sondas PI e H342, pode ser observada na reta de regressão mostrada na figura 10, representada pela equação: $\hat{Y} = 1,64 + 0,82 X$, na qual foi encontrado o coeficiente de determinação de $R^2 = 0,93$.

A equação para acrossomo íntegro, detectada pela sonda FITC-PSA neste protocolo (PI/H342/FITC-PSA/CMXRos) foi: $\hat{Y} = 3,50 + 0,84 X$ e o coeficiente de determinação: $R^2 = 0,92$, como apresentados na figura 11.

A função mitocondrial, detectada pelo CMXRos foi estimada pela equação: $\hat{Y} = 1,50 + 0,80 X$ e apresentou coeficiente de determinação de $R^2 = 0,93$, apresentados na figura 12.

Tabela 3 - Médias $\pm$ desvios padrão (%) de integridade da membrana plasmática, integridade do acrossomo e função mitocondrial obtidos do protocolo PI/H342/FITC-PSA/CMXRos entre os tratamentos T0, T50 e T100 - Pirassununga -2004

Tratamento	Membrana Plasmática Intacta	Acrossomo Intacto	Função Mitocondrial
T0	1,17 $\pm$ 1,53 ^a	2,14 $\pm$ 2,87 ^a	0,50 $\pm$ 0,67 ^a
T50	43,75 $\pm$ 8,24 ^b	47,67 $\pm$ 9,78 ^b	43,83 $\pm$ 8,33 ^b
T100	83,50 $\pm$ 13,55 ^c	86,42 $\pm$ 14,59 ^c	81,17 $\pm$ 13,28 ^c

Letras diferentes dentro da mesma coluna representam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,0001$)

T0 – Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100

T50 – Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50

T100 – Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0

Figura 10 - Integridade de membrana plasmática, no protocolo PI/H342/FITC-PSA/CMXRos, em espermatozoides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0) - Pirassununga -2004

Figura 11 - Acrossomo íntegro, no protocolo PI/H342/FITC-PSA/CMXRos, em espermatozoides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0) - Pirassununga -2004

Figura 12 - Função mitocondrial, verificada pelo CMXRos no protocolo PI/H342/FITC-PSA/CMXRos, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0) - Pirassununga -2004

PROTOCOLO 4:***Associação de PI, H342, FITC-PSA e JC-1***

A classificação das células coradas pela associação do PI, H342, FITC-PSA e JC-1 está descrita no quadro 4 e os padrões de coloração são apresentados na figura 13. O JC-1, diferente das outras sondas para função mitocondrial, foi capaz de identificar duas populações de mitocôndrias: uma com alto potencial de membrana (mitocôndrias coradas em vermelho-alaranjado) e outra com baixo potencial de membrana (mitocôndrias coradas em verde).

Quadro 4 – Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de PI, H342, FITC-PSA e JC-1 - Pirassununga -2004

CÉLULA ESPERMÁTICA	H342	PI	FITC-PSA	JC-1
Membrana plasmática intacta, com acrossomo intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial	+	-	-	vermelho
Membrana plasmática intacta, com acrossomo intacto e com baixo potencial de membrana mitocondrial	+	-	-	verde
Membrana plasmática intacta, com acrossomo lesado e com alto potencial de membrana mitocondrial	+	-	+	vermelho
Membrana plasmática intacta, com acrossomo lesado e com baixo potencial de membrana mitocondrial	+	-	+	verde
Membrana plasmática lesada, com acrossomo intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial	—	+	-	vermelho
Membrana plasmática lesada, com acrossomo intacto e com baixo potencial de membrana mitocondrial	—	+	-	verde
Membrana plasmática lesada, com acrossomo lesado e com alto potencial de membrana mitocondrial	—	+	+	vermelho
Membrana plasmática lesada, com acrossomo lesado e com baixo potencial de membrana mitocondrial	—	+	+	verde

OBS: H342 positivo (+) = núcleo corado em azul
 PI positivo (+) = núcleo corado em vermelho
 FITC-PSA positivo (+) = região do acrossomo verde-amarelada

Figura 13 - Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI, H342, FITC-PSA e JC-1 (aumento 1.000 x). **A.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto, com alto potencial de membrana mitocondrial. **B.** Superior = célula com membrana plasmática lesada (núcleo vermelho), acrossomo intacto, com baixo potencial de membrana mitocondrial, Inferior = célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto, com baixo potencial de membrana mitocondrial. **C.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado, com alto potencial de membrana mitocondrial. **D.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado, com baixo potencial de membrana mitocondrial. **E.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, com baixo potencial de membrana mitocondrial. **F.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, com baixo potencial de membrana mitocondrial - Pirassununga -2004

Os resultados de ANOVA constataram efeitos significativos ($P < 0,0001$) entre os tratamentos T0, T50 e T100 para as porcentagens médias de espermatozóides apresentando integridade de membrana plasmática, integridade de acrossomo e função mitocondrial, sendo que o teste de *Fisher* detectou diferenças significativas ($P < 0,0001$) entre os tratamentos, como apresentado na tabela 4.

A integridade de membrana plasmática, verificada pelas sondas PI e H342, neste protocolo (PI/H342/FITC-PSA/JC-1), foi estimada pela reta de regressão mostrada na figura 14, representada pela equação: $\hat{Y} = 0,78 + 0,92 X$, na qual foi encontrado o coeficiente de determinação de $R^2 = 0,92$.

A equação para acrossomo íntegro, detectada pela sonda FITC-PSA neste protocolo (PI/H342/FITC-PSA/JC-1) foi: $\hat{Y} = 3,82 + 0,81 X$ e o coeficiente de determinação: $R^2 = 0,91$, como apresentados na figura 15.

O potencial de membrana mitocondrial, detectado pelo JC-1 foi estimado pela equação: $\hat{Y} = 0,06 + 0,78 X$ e apresentou coeficiente de determinação de $R^2 = 0,93$, apresentados na figura 16.

Tabela 4 - Médias $\pm$ desvios padrão (%) de integridade da membrana plasmática, integridade do acrossomo e função mitocondrial obtidos do protocolo PI/H342/FITC-PSA/JC-1 entre os tratamentos T0, T50 e T100 - Pirassununga -2004

Tratamento	Membrana Plasmática Intacta	Acrossomo Intacto	Função Mitocondrial
T0	1,00 $\pm$ 1,28 ^a	4,25 $\pm$ 4,73 ^a	0,58 $\pm$ 0,26 ^a
T50	38,91 $\pm$ 11,02 ^b	43,42 $\pm$ 14,30 ^b	38,17 $\pm$ 11,18 ^b
T100	78,17 $\pm$ 12,19 ^c	85,17 $\pm$ 12,11 ^c	78,92 $\pm$ 11,97 ^c

Letras diferentes dentro da mesma coluna representam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,0001$)

T0 – Sêmen fresco: Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100

T50 – Sêmen fresco: Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50

T100 – Sêmen fresco: Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0

Figura 14 - Integridade de membrana plasmática, no protocolo PI/H342/FITC-PSA/JC-1, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0) - Pirassununga -2004

Figura 15 - Acrossomo íntegro no protocolo PI/H342/FITC-PSA/JC-1, em espermatozóides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0) - Pirassununga -2004

Figura 16 - Função mitocondrial, verificada pelo JC-1 no protocolo PI/H342/FITC-PSA/JC-1, em espermatozoides bovinos submetidos aos tratamentos T0 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 0:100), T50 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 50:50) e T100 (Sêmen fresco:Sêmen submetido a *flash frozen*, 100:0) - Pirassununga -2004

6.2 EXPERIMENTO 2: EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO SOBRE AS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL, MITOCONDRIAL E ESTRUTURA DA CROMATINA PELA UTILIZAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES

6.2.1 VOLUME E CONCENTRAÇÃO

Os valores médios de volume seminal e concentração espermática observados do sêmen *in natura* nos diferentes touros estão apresentados na tabela 5. Estes resultados foram obtidos para determinar a taxa de diluição do sêmen, ou seja, determinar o volume de diluidor e de sêmen para a diluição do sêmen para a criopreservação e para o preparo dos protocolos de avaliação.

Tabela 5 – Médias $\pm$ erros padrão da média do volume seminal e concentração espermática do sêmen *in natura* dos diferentes touros em sete colheitas de sêmen - Pirassununga - 2005

TOURO	VOLUME (mL)	CONCENTRAÇÃO ($\times 10^6$ SPTZ/mL)
A99	$7,79 \pm 1,23$	$607,50 \pm 111,59$
A137	$8,36 \pm 0,86$	$650,00 \pm 115,54$
A144	$7,43 \pm 1,25$	$242,50 \pm 40,45$
A149	$6,86 \pm 0,81$	$783,21 \pm 127,01$
A159	$8,50 \pm 0,83$	$546,43 \pm 94,92$
B3	$7,21 \pm 0,86$	$507,50 \pm 95,65$
B18	$5,50 \pm 0,27$	$628,21 \pm 69,60$
B91	$7,21 \pm 0,85$	$624,64 \pm 169,16$
Média Total	$7,34 \pm 0,33$	$573,75 \pm 41,08$

6.2.2 MOTILIDADE E VIGOR

A criopreservação do sêmen afetou a motilidade espermática estimada visualmente, pois esta foi significativamente maior ($P < 0,0001$) no sêmen fresco ($73,13 \pm 0,60\%$) do que pós-descongelação, em ambos os diluidores (Bioxcell[®] = $25,09 \pm 1,31$ e Botu-Bov[®] = $38,57 \pm 1,66\%$), como visualizado na figura 17. Podemos observar ainda que o diluidor Botu-Bov[®] preservou melhor a motilidade ($P < 0,0001$) do que o diluidor Bioxcell[®]. A criopreservação causou uma queda de 48,08 e 34,73% na motilidade, para os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®], respectivamente.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 17 - Motilidade espermática (média $\pm$ erro padrão da média) estimada visualmente no sêmen bovino fresco e criopreservado com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®] - Pirassununga -2005

Também foi possível observar os efeitos da criopreservação sobre o vigor espermático. O vigor dos espermatozóides frescos ($3,20 \pm 0,05$) foi estatisticamente maior ($P < 0,0001$) do que pós-descongelação, em ambos os diluidores, como apresentado na figura 18. O vigor do sêmen diluído com Bioxcell[®] ($2,53 \pm 0,05$) apresentou uma queda maior ($P < 0,0001$) do que aquele diluído com Botu-Bov[®] ($2,82 \pm 0,04$). A queda no vigor foi de 20,93% para o sêmen diluído com Bioxcell[®] e de 11,87% para a amostra de sêmen criopreservada pelo Botu-Bov[®].

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 18 - Vigor espermático (média $\pm$ erro padrão da média) estimado visualmente no sêmen bovino fresco e criopreservado com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®] - Pirassununga - 2005

6.2.3 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA

Na figura 19 é possível verificar que a motilidade espermática avaliada pelo sistema computadorizado apresentou efeitos da criopreservação, com o sêmen fresco apresentando significativamente maior ($P < 0,0001$) motilidade total ($79,98 \pm 1,36\%$) e progressiva ($60,38 \pm 1,98\%$) do que após a criopreservação, nos diluidores Bioxcell[®] (total = $24,18 \pm 1,44\%$, progressiva = $10,71 \pm 0,98\%$) e Botu-Bov[®] (total = $40,13 \pm 1,92\%$; progressiva = $20,86 \pm 1,46\%$). Também a preservação das motilidades total e progressiva foram melhores ($P < 0,0001$) no diluidor Botu-Bov[®] do que no diluidor Bioxcell[®]. A estimativa de perda da motilidade total e progressiva com o processo de criopreservação foi respectivamente de 55,80 e 49,67% para o diluidor Bioxcell[®] e de 39,85 e 39,52% para o diluidor Botu-Bov[®].

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 19 - Motilidade Total e Progressiva (média $\pm$ erro padrão da média) estimadas pelo sistema computadorizado de análise para sêmen bovino fresco e criopreservado com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®] - Pirassununga -2005

As velocidades espermáticas avaliadas pelo CASA, velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL), são apresentadas na figura 20 e denotam uma diminuição ($P < 0,0001$) após a congelação em ambos os diluidores. Os espermatozóides frescos apresentaram resultados mais altos para VAP ($137,57 \pm 1,87 \mu\text{m/s}$), VSL ($121,12 \pm 1,74 \mu\text{m/s}$) e VCL ($193,97 \pm 2,30 \mu\text{m/s}$) do que os espermatozóides pós-congelação. Todavia, podemos observar que em todas estas velocidades analisadas o Bioxcell[®] apresentou valores mais altos ($P < 0,0001$) do que o Botu-Bov[®] em preservar VAP ($92,45 \pm 2,63$ x $80,35 \pm 1,37 \mu\text{m/s}$), VSL ($81,57 \pm 2,39$ x $73,17 \pm 1,30 \mu\text{m/s}$) e VCL ($145,24 \pm 4,11$ x $113,81 \pm 2,06 \mu\text{m/s}$). O percentual de perda de VAP, VSL e VCL com a criopreservação foi respectivamente de 32,80; 32,65 e 25,12% para Bioxcell[®] e de 41,59; 39,59 e 41,32% para Botu-Bov[®].

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 20 - Velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) (médias $\pm$ erros padrão da média) estimadas por sistema computadorizado para sêmen bovino fresco e criopreservado com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®] - Pirassununga -2005

O Deslocamento lateral da cabeça espermática (ALH) foi maior ($P < 0,0001$) nos espermatozóides frescos ($6,34 \pm 0,11 \mu\text{m}$) quando comparado aos espermatozóides pós-criopreservação em ambos os diluidores Bioxcell[®] ($5,74 \pm 0,15 \mu\text{m}$) e Botu-Bov[®] ($4,18 \pm 0,10 \mu\text{m}$) (Figura 21). Também o ALH foi maior ($P < 0,0001$) nos espermatozóides criopreservados com Bioxcell[®] do que com aqueles com Botu-Bov[®].

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 21 - Deslocamento lateral da cabeça (média $\pm$ erro padrão da média) estimado por sistema computadorizado para sêmen bovino fresco e criopreservado com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®] - Pirassununga -2005

A frequência de batimentos (BCF) foi diferente entre os tratamentos, sendo maior para espermatozóides criopreservados com Botu-Bov[®] ($38,48 \pm 0,53$ Hz), seguido dos espermatozóides frescos ($36,22 \pm 0,44$ Hz) e criopreservados com Bioxcell[®] ($33,95 \pm 0,48$ Hz), como é possível verificar no gráfico da figura 22.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 22 - Frequência de batimento (média $\pm$ erro padrão da média) estimada por sistema computadorizado para sêmen bovino fresco e criopreservado com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®] - Pirassununga -2005

A retilinearidade (STR) dos espermatozóides frescos ($86,96 \pm 0,40\%$) não diferiu ($P > 0,05$) daqueles criopreservados com Bioxcell[®] ($87,98 \pm 0,43\%$), mas foi inferior ($P < 0,0001$) àquela de espermatozóides criopreservados com Botu-Bov[®] ($90,38 \pm 0,38\%$). Os espermatozóides congelados com Botu-Bov[®] também apresentaram maior ($P < 0,0001$) STR do que aqueles com Bioxcell[®] (figura 23). Enquanto a linearidade (LIN) foi semelhante ($P > 0,05$) para o sêmen fresco ($64,24 \pm 0,69\%$) e criopreservado com Botu-Bov[®] ($66,07 \pm 0,78\%$) e foi inferior ($P < 0,0001$) para aquele criopreservado com Bioxcell[®] ($58,64 \pm 0,76\%$).

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 23 - Retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) (média $\pm$ erro padrão da média) estimadas por sistema computadorizado para sêmen bovino fresco e criopreservado com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®] - Pirassununga -2005

6.2.4 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Os resultados das características morfológicas estão apresentados na figura 24. Os percentuais de defeitos de acrossomo, defeitos maiores e total de defeitos dos espermatozóides bovinos aumentaram significativamente ($P < 0,0001$) após a criopreservação em ambos os diluidores, sendo este aumento semelhante ($P > 0,05$) entre os diluidores Bioxcell® e Botu-Bov®.

A média de defeitos de acrossomo foi de $2,29 \pm 0,24\%$ para sêmen fresco; $7,67 \pm 0,54\%$ para sêmen criopreservado com Bioxcell® e de $9,30 \pm 0,57$ com Botu-Bov®, o que corresponde ao aumento de 5,38% e 7,02%, para os diluidores Bioxcell® e Botu-Bov®, respectivamente.

O percentual de defeitos maiores foi de $8,14 \pm 0,61$, $14,58 \pm 0,99$ e $15,32 \pm 0,88\%$, para sêmen fresco, criopreservado com Bioxcell® e Botu-Bov®, respectivamente. Os percentuais de aumento foram de 6,44% (Bioxcell®) e 7,18% (Botu-Bov®).

O aumento do total de alterações morfológicas foi de 4,94% (Bioxcell®) e 5,55% (Botu-Bov®), pois o sêmen fresco apresentou média de $13,29 \pm 1,55\%$, o sêmen criopreservado com Bioxcell® apresentou $18,23 \pm 1,64\%$ e com Botu-Bov® $18,84 \pm 1,53\%$.

Os defeitos menores do sêmen fresco ($5,14 \pm 1,30\%$) foi maior ($P < 0,05$) do que aquele do sêmen criopreservado com o diluidor Botu-Bov® ($3,52 \pm 0,95\%$), mas não diferiu ($P > 0,05$) do sêmen criopreservado com Bioxcell® ($3,69 \pm 0,92\%$).

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 24 - Alterações morfológicas (média $\pm$ erro padrão da média) de espermatozoides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®] - Pirassununga -2005

6.2.5 INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL E FUNÇÃO MITOCONDRIAL

Os percentuais de membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e função mitocondrial detectados pela associação de sondas fluorescentes estão apresentados no gráfico da figura 25. Com esses resultados é possível verificar que houve efeito significativo ($P < 0,0001$) da criopreservação do sêmen sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial.

Notou-se que a porcentagem de $78,06 \pm 1,18\%$ de células apresentando membrana plasmática intacta no sêmen fresco caiu para $18,16 \pm 0,97$ e $28,83 \pm 1,11\%$ no sêmen criopreservado com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®], respectivamente. A queda do

percentual de células com membrana plasmática intacta foi de 59,9% (Bioxcell[®]) e 49,2% (Botu-Bov[®]).

Os percentuais de acrossomo intacto diminuíram de $86,08 \pm 0,92$ para $55,26 \pm 1,77$ e $68,83 \pm 0,99\%$ após a criopreservação com Bioxcell[®] e Botu-Bov[®], respectivamente, o que correspondeu a queda de 30,8% e 17,25%. A porcentagem de espermatozóides com função mitocondrial caiu de $76,88 \pm 1,47$ para $16,96 \pm 1,03$ (Bioxcell[®]) e $23,96 \pm 1,06\%$ (Botu-Bov[®]). A queda da função mitocondrial foi de 59,9% (Bioxcell[®]) e 52,9% (Botu-Bov[®]).

É possível notar que o diluidor Botu-Bov[®] foi capaz de preservar melhor ($P < 0,0001$) a integridade das membranas plasmática e acrossomal e a função mitocondrial do que o Bioxcell[®].

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 25 - Porcentagem (média $\pm$ erro padrão da média) de espermatozóides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®] com membrana plasmática intacta (MPI), acrossomo intacto (AI) e com função mitocondrial (CFM) - Pirassununga -2005

Os efeitos da criopreservação do sêmen também foram observados sobre a categoria de células que apresenta membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e função mitocondrial (PIAIC), como mostrado na figura 26. No sêmen fresco a porcentagem de células PIAIC foi de $72,06 \pm 1,43$, essa porcentagem apresentou uma queda 60,87% quando o sêmen foi criopreservado com Bioxcell[®] e de 51,26% quando foi criopreservado com Botu-Bov[®]. Assim, o diluidor Botu-Bov[®] apresentou estatisticamente ($P < 0,0001$) maior número de células PIAIC ($20,80 \pm 1,03\%$) do que Bioxcell[®] ($11,19 \pm 0,90\%$).

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 26 - Média erro $\pm$ padrão da média da porcentagem de espermatozóides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®] contendo membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e função mitocondrial (PIAIC) - Pirassununga -2005

A criopreservação também aumentou ($P < 0,05$) o percentual de células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e sem função mitocondrial (PIAIS), mas não foi diferente ($P > 0,05$) entre os diluidores (figura 27). As médias de PIAIC foram de $5,69 \pm 0,86$; $6,87 \pm 0,59$ e $7,80 \pm 0,99\%$ para sêmen fresco, criopreservado com Bioxcell[®] e Botu-Bov[®], respectivamente.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 27 - Porcentagem (média $\pm$ erro padrão da média) de espermatozóides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®] contendo membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e sem função mitocondrial (PIAIS) - Pirassununga -2005

As categorias de células com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado com (PIALC) e sem função mitocondrial (PIALS) não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) entre os tratamentos (figura 28). Os percentuais médios para as células PIALC foram $0,28 \pm 0,09\%$ para sêmen fresco; $0,03 \pm 0,01\%$ e $0,09 \pm 0,04\%$ para sêmen criopreservado com Bioxcell® e Botu-Bov®, respectivamente. As células PIALS apresentaram média de $0,04 \pm 0,02\%$ $0,08 \pm 0,05\%$ e $0,13 \pm 0,05\%$, para sêmen fresco, criopreservado com Bioxcell® e com Botu-Bov®, respectivamente.

Figura 28 - Porcentagem (média $\pm$ erro padrão da média) de espermatozóides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell® e Botu-Bov® contendo membrana plasmática intacta, acrossomo intacto com (PIALC) e sem função mitocondrial (PIALS) - Pirassununga -2005

A porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com função mitocondrial (PLAIC) do sêmen fresco ($3,04 \pm 0,31\%$) foi semelhante ($P > 0,05$) à do criopreservado com Bioxcell[®] ($2,92 \pm 0,48\%$), mas foi menor ($P < 0,05$) quando o sêmen foi criopreservado com Botu-Bov[®] ($2,04 \pm 0,25\%$) (figura 29). Enquanto, a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com função mitocondrial (PLALC) foi maior ($P < 0,0001$) no sêmen criopreservado com Bioxcell[®] ($2,49 \pm 0,42\%$) do que no sêmen fresco ($1,50 \pm 0,31\%$), sendo no sêmen criopreservado com Botu-Bov[®] menor ($P < 0,0001$) do que no sêmen fresco e criopreservado com Bioxcell[®] (figura 29).

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 29 - Porcentagem (média $\pm$ erro padrão da média) de espermatozoides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®] contendo membrana plasmática lesada, acrossomo intacto (PLAIC) e lesado (PLALC) com função mitocondrial - Pirassununga -2005

No sêmen fresco, a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e sem função mitocondrial (PLAIS) foi de $5,28 \pm 0,41\%$, menor ($P < 0,0001$) do que no sêmen criopreservado em ambos os diluidores, sendo maior com sêmen criopreservado com Botu-Bov[®] ($38,19 \pm 0,89\%$) do que com Bioxcell[®] ($33,93 \pm 1,34\%$) (figura 30). Enquanto, a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem função mitocondrial (PLALS) foi menor ($P < 0,0001$) no sêmen fresco ($12,11 \pm 0,89\%$) do que no criopreservado em ambos os diluidores, mas foi maior ($P < 0,0001$) no sêmen criopreservado com Bioxcell[®] ($42,17 \pm 1,74\%$) do que Botu-Bov[®] ($29,91 \pm 0,98\%$) (figura 30).

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 30 - Porcentagem (média $\pm$ erro padrão da média) de espermatozóides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®] contendo membrana plasmática lesada, acrossomo intacto (PLAIS) e lesado (PLALS) sem função mitocondrial - Pirassununga -2005

6.2.6 INTEGRIDADE DA CROMATINA

A criopreservação do sêmen com Bioxcell[®] não provocou aumento significativo ($P > 0,05$) na porcentagem de cromatina desnaturada (figura 31), mas essa porcentagem aumentou ($P < 0,001$) quando o sêmen foi criopreservado com Botu-Bov[®]. A porcentagem média de cromatina desnaturada foi de $0,80 \pm 0,07$; $1,02 \pm 0,09$ e $1,23 \pm 0,11\%$ para o sêmen fresco, criopreservado com Bioxcell[®] e Botu-Bov[®], respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) nos percentuais de cromatina desnaturada entre os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®].

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 31 - Porcentagem de cromatina desnaturada (média $\pm$ erro padrão da média) de espermatozóides bovinos frescos e criopreservados com os diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®] - Pirassununga -2005

6.2.7 CORRELAÇÕES

Na tabela 6 estão apresentadas as correlações calculadas entre motilidade espermática visual e motilidade obtida pelo CASA, integridade de membrana plasmática por PI e função mitocondrial pelo JC-1.

Tabela 6 – Correlações entre as características de membrana e a avaliação da motilidade espermática avaliadas visualmente e por sistema computadorizado (CASA) - Pirassununga -2005

CARACTERÍSTICAS	r	P
Membrana Plasmática Intacta X Motilidade Visula	0,93	<0,0001
Membrana Plasmática Intacta X Motilidade Total (CASA ¹)	0,91	<0,0001
Membrana Plasmática Intacta X Motilidade Progressiva (CASA)	0,89	<0,0001
Função Mitocondrial X Motilidade Visual	0,90	<0,0001
Função Mitocondrial X Vigor	0,66	<0,0001
Função Mitocondrial X Motilidade Total (CASA)	0,87	<0,0001
Função Mitocondrial X Motilidade Progressiva (CASA)	0,87	<0,0001
PIAIC ² X Motilidade Visual	0,90	<0,0001
PIAIC X Motilidade Total (CASA)	0,88	<0,0001
PIAIC X Motilidade Progressiva (CASA)	0,88	<0,0001

¹CASA – computer-assissted semen analisys – análise computadorizada do sêmen

²PIAIC – Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com função mitocondrial.

7 DISCUSSÃO

7.1 EXPERIMENTO 1: ASSOCIAÇÃO DAS SONDAS FLUORESCENTES PARA AVALIAÇÃO SIMULTÂNEA DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCONDRIAL EM ESPERMATOZÓIDES BOVINOS

A fertilização envolve um processo complexo (ÔURA; TOSHIMORI, 1990) e para ser capaz de completar sua função, a célula espermática precisa, além de alcançar o local de fertilização, penetrar o oócito e ativar o desenvolvimento embrionário (BRAUNDMEIER; MILLER, 2001). Visto a importância da higidez das membranas espermáticas para que todo esse processo ocorra, técnicas mais objetivas de avaliação vêm sendo almejadas. A avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e da função mitocondrial aumenta a acurácia da análise do sêmen, pois fornece maior número de dados para a determinação da porcentagem de células espermáticas na amostra com capacidade para fertilizar o oócito.

Neste sentido, grande ênfase vem sendo dada ao uso das sondas fluorescentes para a avaliação de diferentes estruturas da célula espermática, como relatado numa revisão recente de Gillan et al. (2005) que descrevem sua relação com a capacidade fertilizante do sêmen.

Neste experimento, foram testadas associações de sondas fluorescentes para avaliar simultaneamente a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial. Estes testes são importantes para a obtenção de técnicas que apresentam resultados condizentes com o verdadeiro status de cada estrutura e alta repetibilidade, ainda é imprescindível identificar as sondas que melhor se associam, pois certas sondas quando

associadas a outras podem apresentar resultados variados, alterando suas características e seus padrões de fluorescência.

A possibilidade de se associar sondas fluorescentes para a avaliação simultânea das membranas plasmática e acrossomal em espermatozóides já é bem descrita na literatura (CENTOLA et al., 1990; HENLEY et al., 1994; SUKARDI et al., 1997; ARRUDA, 2000; SOUZA, 2001; ARRUDA et al., 2002; HUO et al., 2002; ARRUDA et al., 2003a; ARRUDA et al. 2003b; NAGY et al., 2003). A associação das sondas PI e FITC-PSA, para avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, respectivamente, como utilizado neste experimento, vem sendo utilizada para espermatozóides de carneiros (SUKARDI et al., 1997), humanos (CENTOLA et al., 1990), eqüinos (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003a) e bovinos (GRAHAM et al., 1990). O PI também foi associado com sondas para avaliar a função mitocondrial como R123, MITO e JC-1, sendo detectadas altas correlações positivas ($r > 0,96$) destas sondas com a motilidade (GARNER et al., 1997). Todavia, a sonda fluorescente, para avaliar a função mitocondrial, que melhor se associa com PI e FITC-PSA, em uma metodologia simples, na qual pouco tempo é requerido foi testada no presente experimento.

A associação de PI, FITC-PSA e R123, descrita no protocolo 1, deste experimento, não resultou num padrão de fluorescência consistente, não sendo possível realizar a leitura com confiabilidade nos diferentes tratamentos para a validação. A associação do PI com R123 realizada por Garner et al. (1997) apresentou bons padrões de fluorescência, apesar da R123 corar inespecificamente porções da cabeça e da cauda do espermatozóide. As alterações nos padrões de coloração ocorridas neste protocolo podem ser devidas a competição da emissão da fluorescência por FITC-PSA e R123, já que ambas apresentam comprimentos de onda semelhantes, o que pode gerar modificações nos padrões de fluorescência quando associadas.

A primeira citação na literatura sobre a associação de sondas fluorescentes para avaliar simultaneamente membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial em espermatozóides bovinos foi de Graham et al. (1990) usando um sistema de citometria de fluxo. Para esta avaliação, os autores utilizaram PI, PSA e R123, a mesma associação descrita neste protocolo. Todavia, o PSA no citado trabalho não foi conjugado com FITC, mas com a ficoeritrina (PE); apesar de mencionada a troca, nenhuma explicação é dada para justificá-la, por isso neste trabalho, foi testada a associação, já que não se dispunha do PSA conjugado com PE, mas sim com FITC.

A associação do PI, FITC-PSA e MITO, no protocolo 2, resultou em marcações bastante consistentes dos espermatozóides, tornando fácil a identificação das estruturas avaliadas. A associação de PI com MITO foi descrita por Garner et al. (1997), mas nenhum tratamento de validação foi realizado por estes autores. Os tratamentos do sêmen (T100, T50 e T0) foram preparados para validar a técnica, seguindo uma metodologia igual a citada por Thomas et al. (1997). Os resultados obtidos nos tratamentos foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de *Fisher*. Esta comparação dos resultados obtidos dos tratamentos e a confirmação da diferença entre eles foram importantes para determinar a eficiência do tratamento na validação da técnica antes de submetê-la à análise de regressão linear.

Como confirmado pelos resultados da análise de regressão, o protocolo 2, cuja sonda para determinar a função mitocondrial foi o MITO, apresentou bons resultados e alta repetibilidade. Algumas características sobre o MITO foram notadas. O MITO quando se liga às mitocôndrias com potencial de membrana, emite fluorescência verde bem intensa; todavia, é importante salientar que ele também se liga a porções da membrana espermática tanto na cabeça quanto na cauda de forma inespecífica, emitindo fluorescência menos intensa como observado também por Garner et al. (1997). Esta ligação inespecífica do MITO, de certa

forma, é benéfica para a avaliação, pois torna possível visualizar o esboço das células com membrana plasmática intacta. Contudo, a diferenciação do nuance da coloração da peça intermediária pode acarretar subjetividade na leitura. Na tentativa de tornar esta técnica mais objetiva, algumas alterações no protocolo foram propostas, como a redução da concentração de MITO para evitar a ligação inespecífica e a adição de H342 para visualizar as células com membrana plasmática intacta. Entretanto, nenhuma destas alterações foi bem sucedida, não sendo possível visualizar bons padrões de fluorescência que superassem o protocolo inicial.

Pela equação obtida na análise de regressão para integridade de membrana plasmática (figura 6), avaliada pela exclusão do PI do núcleo, nesta associação, é possível verificar que o valor de “a” (é o ponto em que a reta corta o eixo Y, ou seja, expressa o valor de Y quando $X=0$) é muito próximo a zero ($a=0,40$), como era de se esperar para uma amostra que foi submetida a *flash frozen*, com o objetivo de lesar todas as membranas. O valor de “b” (coeficiente de regressão, ou seja, quanto X aumenta em relação a Y) também é muito próximo do esperado ($b=0,79$), já que T100, representava uma amostra com no mínimo de 80% de motilidade. O coeficiente de regressão de 95% afirma estas observações. Resultado semelhante foi observado por Graham et al. (1990) que compararam a eficiência do PI isolado com a técnica de coloração por eosina/nigrosina e encontraram correlação positiva ($r=0,78$) entre as técnicas e intervalo de confiança de 95%. Correlação positiva entre PI e eosina/nigrosina também tem sido observada em espermatozóide de cão ($r=0,88$) (PEÑA et al., 1998), de cachaco ($r=0,71$) e de touro ($r=0,83$) (PINTADO et al., 2000). Pintado et al. (2000) também observaram altas correlações positivas entre PI e H258 em espermatozóides suínos ($r=0,96$) e bovinos ($r=0,94$).

Coefficientes semelhantes foram observados, na mesma associação, pela equação de regressão calculada para a integridade de acrossomo (figura 7), verificada pela sonda FITC-PSA. O valor de “a” (8,51) é muito próximo ao esperado, o valor um pouco mais alto que zero

pode ser em decorrência da presença de células cuja membrana acrossomal está toda destacada, sem nenhum ponto de ligação ao PSA. O valor de “b” (0,81) também reflete o desejado e o valor do coeficiente de determinação de 95% constata a eficiência da técnica. A eficiência do FITC-PSA foi avaliada por Graham et al. (1990) pela comparação com a coloração de amarelo de naftol/eritrosina b, encontrando um intervalo de confiança de 95%.

A equação obtida para a função mitocondrial, com o MITO associado ao PI e FITC-PSA, apresentou uma característica diferente daquelas para integridade de membrana plasmática e integridade de acrossomo. Apesar do coeficiente de determinação ser suficientemente alto ($R^2=0,84$) para assegurar a eficiência da técnica, os valores de “a” (35,00) e de “b” (0,55) foram acima e abaixo dos esperados, respectivamente. A explicação para estes resultados foi discutida, ficando dúvidas se o tratamento pelo *flash frozen* não foi suficiente para lesar todas as membranas mitocondriais ou se a coloração do MITO inespecificamente poderia interferir na leitura. Esta mesma técnica, com uma pequena alteração, foi validada para espermatozóides eqüinos (CELEGHINI et al., 2004) com a mesma metodologia e apresentou uma equação ($\hat{Y}=9,57+0,78 X$) com resultados mais esperados, com o coeficiente de determinação de 93%. A elucidação para estas diferenças poderia estar na diferença da espécie ou mesmo na maior habilidade técnica em diferenciar os nuances de coloração do MITO quando ligado à membrana mitocondrial com ou sem potencial.

Pensando que se para fazer a leitura desta técnica é preciso habilidade em diferenciar os espermatozóides com e sem função mitocondrial, a objetividade da técnica é perdida, e volta-se a subjetividade. Dessa forma, com a meta de aumentar a objetividade das técnicas de avaliação foram determinados os protocolos 3 e 4, associando-se FITC-PSA, H342, PI e CMXRos e FITC-PSA, H342, PI e JC-1, respectivamente.

A adição do H342 aos protocolos 3 (CMXRos) e 4 (JC-1) foi realizada para a visualização das células que não coram com PI, FITC-PSA e CMXRos ou JC-1.

Da mesma maneira para o protocolo 2, os tratamentos (T0, T50 e T100) nos protocolos 3 e 4 foram submetidos a ANOVA e ao teste de *Fisher*, para verificar se os tratamentos foram diferentes e então submeter os resultados à análise de regressão linear. As retas de regressão foram traçadas a partir dos diferentes tratamentos no sêmen (T0, T50 e T100) para as características espermáticas avaliadas por cada sonda.

Os resultados obtidos na análise de regressão pelas duas técnicas foram muito parecidos. Para a integridade de membrana plasmática por PI e H342 os valores de “a” e “b” foram muito próximos aos esperados nos protocolos 3 e 4, com as retas de regressão estimadas pelas equações $\hat{Y} = 1,64 + 0,82 X$ (CMXRos) e $\hat{Y} = 0,78 + 0,92 X$ (JC-1) e os coeficientes de determinação de 93 e 92%, respectivamente.

A integridade de acrossomo nos protocolos 3 e 4, detectada pelo FITC-PSA também apresentou resultados com altos coeficientes de determinação de 92 e 91%, respectivamente. As equações de regressão para os protocolos 3 ($\hat{Y} = 3,50 + 0,84 X$) e 4 ($\hat{Y} = 3,82 + 0,81 X$) também revelaram valores muito parecidos para “a” e “b”.

A função mitocondrial avaliada pelas sondas CMXRos e JC-1, nos protocolos 3 e 4 apresentou resultados bastante semelhantes. As equações para o CMXRos ($\hat{Y} = 1,50 + 0,80 X$) e para o JC-1 ($\hat{Y} = 0,06 + 0,78 X$) ficaram bem próximas ao esperado. Resultado parecido foi encontrado por Gravance et al. (2000) na validação do JC-1 para avaliar função mitocondrial de espermatozóides eqüinos ($\hat{Y} = 8,36 + 0,84 X$, $R^2 = 0,97$). É importante levar em consideração que o JC-1 é diferente das outras sondas para avaliação da função mitocondrial, pois identifica duas populações de mitocôndrias: uma com alto potencial de membrana (mitocôndrias coradas em vermelho-alaranjado) e outra com baixo potencial de membrana (mitocôndrias coradas em verde). Resultados semelhantes foram obtidos por Garner et al. (1997) quando associaram PI com R123, MITO ou JC-1. Verificaram que a associação foi

possível e que JC-1 apresentou vantagem sobre R123 e MITO por diferenciar alto e baixo potencial de membrana mitocondrial.

Com os resultados dos protocolos 3 e 4 ficou claro que, a técnica de *flash-frozen* foi eficiente em lesar todas as membranas, incluindo a mitocondrial, sanando a dúvida deixada pelos resultados obtidos no protocolo 2.

Os coeficientes de determinação mais altos para CMXRos ($R^2=0,93$) e para JC-1 ($R^2=0,93$) do que para MITO ($R^2=0,84$), podem ser explicados pela maior objetividade das técnicas, pois o CMXRos não apresentou ligação inespecífica, marcando apenas a peça intermediária que apresentou mitocôndrias com função; enquanto o JC-1, marcou de forma bem diferente mitocôndrias com alto (vermelho-alaranjado) e baixo (verde) potencial de membrana.

O mesmo tratamento realizado neste experimento foi realizado por Thomas et al. (1997) para avaliar a associação de PI, SYTO-17 e FITC-PNA. Esta associação permitiu avaliar a integridade da membrana plasmática e de acrossomo somente. A porcentagem de espermatozóides vivos, corados por SYTO-17 nos grupos 100:0, 50:50 e 0:100 (proporção de espermatozóides vivos:mortos) foi de 84, 37 e 4%, respectivamente. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos neste experimento nos protocolos 2, 3 e 4 para integridade de membrana detectada pela exclusão do PI do núcleo.

Apesar do alto custo do aparelho de citometria de fluxo, há uma tendência para sua aplicação futura. No entanto, é importante lembrar que as técnicas de avaliação dos diferentes compartimentos espermáticos por sondas fluorescentes devem ser validadas por análises de microscopia de epifluorescência, antes de serem aplicadas ao sistema de citometria de fluxo para a leitura da amostra. O citômetro de fluxo não permite a visualização do padrão de coloração das células, o que pode causar leituras errôneas quando as células não são coradas corretamente. As avaliações por microscopia, por sua vez, permitem verificar a forma com

que cada célula é preenchida pelo corante e a intensidade com que a sonda emite a fluorescência, podendo identificar alterações como turbidez do meio ou quantidade insuficiente da sonda fluorescente que mascare a leitura pelo citômetro de fluxo. Após a validação da metodologia pela microscopia de epifluorescência, o uso do citômetro de fluxo traz grandes vantagens, como descritas por Braundmeier e Miller (2005), podendo citar a acurácia do teste devido ao elevado número de espermatozóides contados em um período de tempo reduzido, contando 10.000 células em menos de 1 minuto (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003a).

Todos os testes laboratoriais de análise de sêmen buscam a predição da capacidade fertilizante do sêmen. As técnicas validadas aqui apresentaram resultados bastante satisfatórios sobre o status das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozóides bovinos; todavia, um teste de fertilidade seria de grande valia para definir se tais técnicas refletem realmente o potencial fertilizante do sêmen. Tartaglione e Ritta (2004) verificaram que a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal foi mais correlacionada com a taxa de fertilização *in vitro* do que a motilidade e morfologia espermáticas. Estes autores observaram que a combinação do corante eosina/nigrosina com o teste hipoosmótico apresentou coeficiente de 78% de correlação com a taxa de fertilidade *in vitro*. Quando esses resultados foram incluídos no modelo de regressão juntamente com os resultados de Trypan Blue/Giemsa, que avalia integridade das membranas plasmática e acrossomal, este coeficiente aumentou para 82,4%. Com estes resultados pode-se sugerir que quanto maior o número de análises realizadas, maior a capacidade em predizer a fertilidade.

Contraditoriamente, Brito et al. (2003) não encontraram correlação significativa entre taxa de fertilização *in vitro* e integridade de membrana plasmática em bovinos, pelas técnicas de eosina/nigrosina, Trypan blue/Giemsa, CFDA/PI, SYBR-14/PI e teste hipoosmótico. Alm et al. (2001) observaram correlação significativa ($P=0,016$), mas baixa ($r=0,05$) entre

viabilidade espermática, detectada pelo PI num ensaio fluorimétrico automatizado, e fertilidade, em sêmen criopreservado de touros.

Contudo, Januskauskas et al. (2003) encontraram correlações significativas ($P < 0,05$) entre fertilidade a campo após IA com sêmen criopreservado bovino, pela observação da taxa de não retorno ao estro aos 56 dias, e espermatozóides com membrana plasmática lesada, positivas ao PI, sobre partidas de sêmen ($r = -0,40$) e sobre touros ($r = -0,56$). Anzar et al. (2002) também observaram correlações negativas entre fertilidade a campo e espermatozóides corados com PI ($r = > -0,87$) em sêmen fresco bovino.

Correlações entre fertilidade a campo e espermatozóides com membrana plasmática lesada, detectada por fluorimetria com PI, foram negativas entre partidas ($r = -0,39$) e touros ($r = -0,57$). Ainda, correlações positivas entre fertilidade e espermatozóides com membrana plasmática intacta, negativas ao H258 por microscopia de epifluorescência, foram observadas entre partidas ($r = 0,50$) e touros ($r = 0,58$) (JANUSKAUSKAS et al., 2001).

Portanto, testes devem ser realizados para verificar a existência de correlações dos protocolos validados neste experimento com a fertilidade, sobretudo, este não foi escopo deste trabalho.

A partir dos resultados obtidos neste experimento foi possível escolher uma técnica que melhor se adequasse para avaliar os efeitos da criopreservação sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial de espermatozóides bovinos, realizada no experimento 2. Apesar dos protocolos 2, 3 e 4 apresentarem resultados semelhantes, o protocolo 4, que consiste no uso do JC-1 para a avaliação da função mitocondrial, foi o de escolha, devido sua característica em separar duas populações de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial.

7.2 EXPERIMENTO 2: EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO SOBRE AS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL, MITOCONDRIAL E ESTRUTURA DA CROMATINA PELA UTILIZAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES

Neste experimento foram avaliados os efeitos que a criopreservação pode causar às células espermáticas. Na literatura é relatado que o processo de criopreservação causa danos nos espermatozóides, que podem ser ultra-estruturais, físicos, bioquímicos ou funcionais (SALAMON; MAXWELL, 1995). Os danos incluem mudanças na fluidez das membranas com aumento do volume e ruptura das membranas plasmática e acrossomal (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995; HOLT, 2000), modificações na arquitetura mitocondrial (COUNTERS et al., 1989) e condensação anormal da cromatina (JANUSKAUSKAS et al., 2003). Tais alterações podem conduzir a falha na taxa de fertilidade, uma vez que, a integridade e a funcionalidade de todas essas estruturas espermáticas são requeridas para a fertilização e desenvolvimento embrionário (ÕURA; TOSHIMORI, 1990).

A avaliação do sêmen tem como objetivo prever sua capacidade de fertilizar antes de ser usado em fertilização *in vivo* ou *in vitro* (TARTAGLIONE; RITTA, 2004). Visto a grande importância econômica e biológica em estimar o potencial de fertilidade do sêmen congelado bovino, este experimento foi conduzido com técnicas mais objetivas na tentativa de verificar o comportamento de cada estrutura espermática, bem como do movimento da célula frente a criopreservação e uso de diluidores diferentes.

Os efeitos dos diluidores e de seus componentes sobre a congelabilidade do sêmen vem sendo descritos em diversas publicações científicas (FISER; FAIRFULL, 1984; CRISTANELLI et al., 1985; AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT; GRAHAM, 1992; DE LEEUW et al., 1993; WATSON, 1995; SQUIRES et al., 1999; KARABINUS et

al., 1999; ZÜGE, 1999; MEIRELLES et al., 1999; LAGARES et al., 1999; HOLT, 2000; ARRUDA, 2000; GILMORE et al., 2000; CURRY, 2000; BAILEY et al., 2000; SZTEIN et al., 2001; HUO et al., 2002; ALVARENGA, 2002; COTTORELLO; HENRY, 2002; ARRUDA et al., 2003b; MEDEIROS, 2003; ALBERTI et al., 2004; FORERO-GONZALEZ, 2004; AMIRAT et al., 2004; NEVES NETO et al., 2004), assim, um novo diluidor (Botu-Bov[®]), desenvolvido pela equipe coordenada pelo Prof. Dr. Frederico Osanam Papa (Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-UNESP, Botucatu-SP), que vem apresentando resultados promissores na melhora da congelabilidade do sêmen bovino (ALBERTI et al., 2004), foi comparado a um diluidor comercial de amplo uso por centrais de congelação e comercialização de sêmen bovino mundialmente (Bioxcell[®]).

7.2.1 EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE O MOVIMENTO ESPERMÁTICO

A motilidade espermática é uma das mais importantes características associadas com a capacidade fertilizante do sêmen, sendo reconhecida há muito tempo como essencial para o transporte do espermatozóide através do trato reprodutivo feminino e para fertilização (JANUSKAUSKAS et al., 2001; VERSTEGEN et al., 2002); apesar de que testes de fertilização *in vitro* não foram correlacionados com motilidade (TARTAGLIONE; RITTA, 2004).

A diminuição da motilidade espermática avaliada visualmente após a criopreservação, observada neste experimento, é uma das ocorrências mais bem relatadas na literatura sobre os efeitos da criopreservação (FISER et al., 1982; CRISTANELLI et al., 1985; VALCÁRCEL et al., 1994; THOMAS et al., 1998; ARRUDA, 2000, PEÑA-MARTÍNEZ, 2004; VIANNA, 2005).

O percentual de queda da motilidade visual diferiu conforme o diluidor utilizado, sendo de 48,08 (Bioxcell®) e 34,73% (Botu-Bov®), o que pode indicar que componentes presentes nos meios atuaram de forma diferente sobre as estruturas espermáticas, principalmente sobre aquelas que estão envolvidas na motilidade celular, como integridade da membrana plasmática, integridade das estruturas flagelares e função mitocondrial. Nath (1972) verificou que em torno de 40 a 50% dos espermatozóides pós-descongelamento apresentam danos mitocondriais e prejuízos na estrutura do axonema, sendo que esta última alteração morfológica pode ser devida à despolimerização parcial dos microtúbulos.

Semelhante à motilidade, o vigor sofreu influência da criopreservação, contudo, o percentual de perda com a congelamento foi inferior àquela observada para a motilidade, de 20,93% para sêmen congelado com Bioxcell® e de 11,87% com Botu-Bov®, notando também a diferença entre os diluidores. Da mesma forma, Januskauskas et al. (2001; 2003) avaliaram subjetivamente motilidade e linearidade no sêmen bovino criopreservado. A linearidade subjetiva pode ser correspondente ao vigor avaliado neste experimento. Correlações entre a linearidade subjetiva e a taxa de fertilidade foram encontradas, as quais variaram em experimentos diferentes de 60 a 64% (JANUSKAUSKAS et al., 2001) e de 51 a 58% (JANUSKAUSKAS et al., 2003) com touros da mesma raça e sêmen criopreservado com o mesmo diluidor.

Os percentuais de motilidade total e progressiva detectados pelo CASA também diminuíram consideravelmente após a criopreservação do sêmen, o mesmo foi relatado por outros autores (VALCÁRCEL et al., 1994; O'CONNELL et al., 2002; VERSTEGEN et al., 2002; PEÑA-MARTÍNEZ, 2004; PETRUNKINA et al., 2005). Essa queda foi diferente entre os diluidores utilizados: para o diluidor Bioxcell® a redução foi de 55,80% e 49,67%, para as motilidades total e progressiva, respectivamente; enquanto, o sêmen que foi diluído em Botu-Bov® apresentou redução de 39,85% e 39,52%, para as motilidades total e progressiva,

respectivamente. Estes resultados indicam que a preservação da motilidade avaliada pelo CASA, da mesma forma que para a motilidade avaliada visualmente, foi influenciada por diferentes componentes do meio de congelação, o que também foi constatado por Petrunkina et al. (2005), que verificaram que o uso de diluidores com componentes diferentes pode ser melhor na preservação da motilidade do sêmen pós-descongelção. Cristanelli et al. (1985) também observaram melhor preservação da motilidade de espermatozóides de garanhões pós-descongelção com diluidor contendo maior concentração de gema de ovo. Amirat et al. (2004) verificaram melhor motilidade espermática pós-criopreservação quando o sêmen bovino foi diluído com meio contendo lipoproteína de baixa densidade isolada em relação ao meio contendo gema de ovo (54,4 x 30,2%). Embora tenham sido claros os efeitos dos diluidores neste experimento, os constituintes exatos dos diluidores testados não são divulgados por sigilo industrial, desta forma, esta discussão será restrita aos efeitos da congelação entre diluidores de composição diferente, subjugando-se ao conjunto, não sendo discutidos os efeitos de cada constituinte.

A análise computadorizada fornece cálculos mais precisos da velocidade e da trajetória de cada célula espermática, dos quais alguns têm sido correlacionados com fertilidade, sendo que combinações de mais variáveis do CASA apresentaram mais alta correlação com a fertilidade (FARRELL et al., 1998).

A diminuição nos valores de VAP, VSL e VCL após a criopreservação do sêmen, detectada neste trabalho, também foram verificadas para sêmen canino (PETRUNKINA et al., 2005) e humano (O'CONNELL et al., 2002).

O CASA apresentou resultados discordantes entre os diluidores, pois apesar do diluidor Botu-Bov[®] proporcionar melhor preservação da motilidade total e motilidade progressiva do que o Bioxcell[®], as velocidades espermáticas avaliadas, VAP, VSL e VCL, foram mais altas para o Bioxcell[®]. Este achado poderia ser explicado por diferenças na

densidade entre os diluidores ou presença de partículas maiores, que poderiam interferir na velocidade espermática. Referindo-se a isso, Mortimer (1997) relatou que o aumento da viscosidade do meio externo dos espermatozóides resulta em diminuição da amplitude da onda flagelar. Alberti et al. (2004) também verificaram efeitos dos diluidores sobre VAP, VSL e VCL, mas não sobre motilidades total e progressiva, enquanto, Amirat et al. (2004) observaram valores mais altos para motilidade, VCL e VAP para um diluidor contendo lipoproteína de baixa densidade do que para outro com gema de ovo, todavia, não observaram diferenças entre VSL.

Um ponto divergente nos resultados deste experimento foi a observação de maior ALH nos espermatozóides frescos do que após a criopreservação. Numa avaliação geral o deslocamento lateral da cabeça do espermatozóide não é desejado, pois pode interferir na progressão da célula, o que condiz com a afirmação de Arruda (2000) de que maior valor numérico de ALH se traduz em pior qualidade espermática. Todavia, este valor foi determinado matematicamente e ainda não são estabelecidos limites máximos e mínimos para dizer o quanto de deslocamento da cabeça poderia interferir na motilidade progressiva ou mesmo na capacidade da célula em atravessar o trato reprodutivo feminino e alcançar o local de fertilização do oócito. O'Connell et al. (2002) não encontraram diferença no ALH em sêmen fresco e pós-criopreservação. O mais baixo valor de ALH encontrado para sêmen congelado com Botu-Bov[®] pode ser tido como uma vantagem para este diluidor. Amirat et al. (2004) não encontraram diferenças de ALH entre diluidores diferentes, ao passo que Arruda (2000) observou diferença entre diluidores em espermatozóides eqüinos.

Essa diferença no ALH pode ser uma razão pela qual os resultados obtidos do vigor avaliado visualmente foi diferente, entre os diluidores, daqueles obtidos de velocidades pelo CASA. Se o vigor é definido pela velocidade que o espermatozóide cruza o campo óptico, era de se esperar que seus resultados fossem parecidos aos de velocidade obtidos pelo CASA

(VAP, VSL e VCL). Todavia, quando é realizada a avaliação visual do vigor espermático, estima-se um valor inferior quando as células apresentam maior deslocamento lateral de cabeça. Essa observação é possível de ser visualizada pela comparação das figuras 18, 20 e 21.

A BCF mais alta para o sêmen criopreservado com Botu-Bov[®] do que para o sêmen fresco, foi contrária aos achados de O'Connell et al. (2002), o que pode sugerir que componentes presentes neste diluidor poderiam estar agindo para estimular a frequência de batimentos. Uma vez que o processo de criopreservação afeta as mitocôndrias, prejudicando assim, a produção de ATP, e até mesmo as estruturas flagelares, seria esperado que a BCF fosse menor após a criopreservação, conforme foi visto com o sêmen criopreservado com Bioxcell[®]. Entretanto, Arruda (2000) também encontrou diferenças de BCF entre diluidores diferentes para espermatozóides de eqüino.

Apesar do STR ser estatisticamente maior para espermatozóides criopreservados com Botu-Bov[®] do que para o sêmen fresco ou criopreservado com Bioxcell[®], não se sabe se as diferenças de 3,42% entre Botu-Bov[®] e sêmen fresco e de 2,40% entre Botu-Bov[®] e Bioxcell[®], poderiam afetar a fertilidade do sêmen, considerando que a porcentagem média foi em torno de 90%. Estes resultados se assemelham aos encontrados por Arruda (2000) para espermatozóides eqüinos congelados em diferentes diluidores.

Os resultados de LIN após a criopreservação com diluidor Botu-Bov[®] (figura 23) diferiram dos observados por O'Connell et al. (2002) e Petrunkina et al. (2005), que verificaram menor LIN após a criopreservação do sêmen, mas vão de acordo com os obtidos quando o sêmen foi criopreservado com Bioxcell[®]. Por outro lado, Amirat et al. (2004) não observaram diferenças de LIN entre diluidores, diferindo de Arruda (2000) que encontrou diferença entre os diluidores utilizados. Contudo, o valor desta variável deve ser melhor

estudada, já que Januskauskas et al. (2003) não encontraram correlação entre LIN (CASA) e taxa de fertilidade em bovinos.

7.2.2 EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

A análise cuidadosa da morfologia espermática tem uma grande importância na rotina do exame do sêmen e é considerada uma análise para estimar o potencial de fertilidade (OMBELET et al., 1995; VERSTEGEN et al., 2002; ZAHALSKY et al., 2003).

O aumento dos percentuais de defeitos da morfologia espermática após a criopreservação encontrados aqui também é bem relatado (O'CONNELL et al., 2002; VERSTEGEN et al., 2002; PETRUNKINA et al., 2005), principalmente o aumento de defeitos de acrossomo (VERSTEGEN et al., 2002; PETRUNKINA et al., 2005). Após a congelação do sêmen, a motilidade é mais bem preservada do que a integridade acrossomal dos espermatozóides (TARESSON et al., 1977). Os danos no acrossomo podem ocorrer durante o processo de resfriamento, congelação ou mesmo durante a descongelação (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTED et al., 1990; WATSON, 1995).

Falhas na fertilização são associadas a altas porcentagens de espermatozóides com defeitos de acrossomo ou formas anormais, pois a integridade morfológica e integral do acrossomo é um pré-requisito para adesão e ligação do espermatozóide à zona pelúcida para a subsequente reação acrossomal (VERSTEGEN et al., 2002).

Apesar de não serem detectadas diferenças sobre a porcentagem de defeitos de acrossomo dos espermatozóides criopreservados nos diluidores Bioxcell[®] e Botu-Bov[®], Petrunkina et al. (2005) notaram que diluidores contendo Equex STM apresentou melhor preservação da integridade do acrossomo de espermatozóides criopreservados de cães.

O aumento de defeitos maiores verificados neste experimento ocorreu devido, principalmente, ao aumento dos defeitos de acrossomo, a mesma observação pode ser feita para o aumento dos defeitos totais.

O'Connell et al. (2002) observaram aumento de 37% ($P < 0,001$) de anormalidades espermáticas após a criopreservação de sêmen humano. Muito acima dos aumentos encontrados neste experimento (Bioxcell[®] = 4,94% e Botu-Bov[®] = 5,55%).

Sistemas computadorizados estão sendo desenvolvidos para a análise mais objetiva da morfologia espermática. Arruda (2000) observou por análise computadorizada da morfometria espermática, que a criopreservação causou retração no comprimento da cabeça espermática em eqüinos. Gravance et al. (1996) padronizaram os procedimentos para a avaliação computadorizada da cabeça espermática em touros.

A queda no percentual de defeitos menores, observada após a criopreservação, estatisticamente para Botu-Bov[®] e numericamente para Bioxcell[®], pode ser devida à perda de gotas distais durante o processamento da criopreservação, ou mesmo pela migração de células que apresentavam defeitos menores e passaram a apresentar defeitos maiores, como defeitos de acrossomo.

7.2.3 EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE AS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCODRIAL DOS ESPERMATOZÓIDES

Os efeitos da criopreservação do sêmen, observados sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, detectados pelas sondas fluorescentes, confirmam os relatos literários (AMANN; PICKETT, 1987; COUNTERS et al., 1989; HAMEMESTEDT et al., 1990; WATSON, 1995; PETRUNKINA et al., 2005). A qualidade do sêmen criopreservado bovino pode ser avaliada por uma variedade de corantes e técnicas fluorescentes específicas às organelas (THOMAS et al., 1997; GARNER et al., 1997; THOMAS et al., 1998). Neste

experimento, os efeitos da criopreservação e dos diluidores sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitoncondrial foram testados pela associação de sondas fluorescentes definida no protocolo 4 do experimento 1.

A porcentagem de membrana plasmática lesada devido a criopreservação foi de 59,90% e 49,23%, para o sêmen diluído em Bioxcell® e Botu-Bov®, respectivamente, ou seja, acima do percentual de perda da motilidade, o que corrobora os achados de Salamon e Maxwell (1995) de que a célula espermática pode ser móvel, mas estar danificada, de tal maneira que a penetração e fertilização do oócito seja improvável. O mesmo autor relatou ainda que, apesar de 40 a 60% dos espermatozóides de carneiros apresentarem motilidade pós-descongelção, somente 20 a 30% deles permaneceram biologicamente inalterados. Este achado também foi verificado por Valcárcel et al. (1994), que utilizaram as sondas CFDA e PI para avaliar a integridade da membrana plasmática de espermatozóides de carneiros. Estes autores verificaram que, imediatamente após a descongelção, 40 a 50% dos espermatozóides eram móveis; enquanto, somente 17% apresentaram membrana plasmática intacta e após um período de incubação de 8 horas a 37° C a motilidade caiu para 10 a 15%, comparável ao percentual de espermatozóides com membrana plasmática intacta, os quais permaneceram constantes durante o período de incubação. Com estes achados, Valcárcel et al. (1994) indicaram a integridade da membrana plasmática, determinada por sondas fluorescentes, como sendo um marcador mais sensível da viabilidade de espermatozóides de carneiros, e da estimativa da sobrevivência espermática a 37° C, após a descongelção, já que verificaram correlação positiva ($r=0,64$) entre a motilidade após 8 horas de incubação a 37° C e integridade de membrana plasmática logo após a descongelção.

Valcárcel et al. (1994) verificaram uma queda de 70% na integridade da membrana plasmática dos espermatozóides de carneiros após a criopreservação do sêmen, mantendo-se apenas 15% das membranas intactas. Resultados semelhantes foram observados por Forero-

Gonzalez (2004) para espermatozóides bovinos, em que as porcentagens de membrana plasmática intacta após a criopreservação foi de 15,58 e 16,68%, utilizando o diluidor Tris (fração única) com glicerol. Resultados estes semelhantes aos obtidos neste experimento para o diluidor Bioxcell[®] ($18,16 \pm 0,97\%$), mas inferiores aos conseguidos com o diluidor Botu-Bov[®] ($28,83 \pm 1,11\%$).

Estes danos causados pela congelação são, de acordo com Watson (1995), decorrentes das mudanças de temperatura a que os espermatozóides são submetidos durante o processo de resfriamento, dos efeitos deletérios dos componentes do meio e do próprio crioprotetor e, finalmente, dos efeitos da descongelação.

Os efeitos dos diluidores observados aqui confirmam as observações feitas por De Leeuw et al. (1993) que relataram efeitos dos componentes do diluidor sobre a integridade da membrana plasmática de espermatozóides resfriados a 5° C e congelados de bovinos. Todavia, Alberti et al. (2004) não verificaram diferença estatística entre dois diluidores (MC e glicina-gema) sobre a integridade de membrana plasmática de espermatozóides bovinos. Da mesma forma, Amirat et al. (2004) não verificaram diferença da integridade de membrana plasmática quando comparou um diluidor contendo lipoproteína de baixa densidade a um diluidor contendo gema de ovo. Lembrando da observação de Amann e Pickett (1987) de que a lipoproteína de baixa densidade presente na gema do ovo é responsável pela proteção da membrana durante a criopreservação, pode-se sugerir que estes achados de Amirat et al. (2004) podem significar que, tanto adicionada isoladamente, quanto como parte da gema do ovo, a ação da lipoproteína sobre a membrana é semelhante ou, como estes autores utilizaram o teste hipoosmótico para detectar a integridade da membrana plasmática, pode-se questionar se em um teste laboratorial mais preciso não seria possível verificar diferenças na integridade da membrana plasmática, uma vez que tais autores, encontraram melhor motilidade e maior taxa de clivagem de embriões produzidos *in vitro*, quando o sêmen foi criopreservado em

diluidor contendo lipoproteína de baixa densidade do que quando foi utilizado diluidor contendo gema de ovo.

A integridade das membranas plasmática e acrossomal tem sido mais correlacionada com a taxa de fertilidade *in vitro* do que motilidade e morfologia (TARTAGLIONE; RITTA, 2004). As correlações observadas por Januskauskas et al. (2001) entre membrana plasmática lesada, detectada pelo PI por fluorimetria, e a taxa de fertilidade foram negativas, mas baixas ($r = -0,39$, por partidas e $r = -0,57$, por touros); enquanto, entre a porcentagem de espermatozóides vivos, negativos ao H258 por microscopia de epifluorescência, foram positivas ($r = 0,50$, por partida e $r = 0,58$, por touros).

Os percentuais de acrossomos danificados pela criopreservação, identificados pela sonda FITC-PSA, foram de 30,82 e 17,25%, nos diluidores Bioxcell® e Botu-Bov®, respectivamente, muito acima do percentual detectado pela microscopia de interferência diferencial de 5,38% (Bioxcell®) e 7,01% (Botu-Bov®). Contraditoriamente, Thomas et al. (1997) testaram várias técnicas de avaliação da integridade do acrossomo em sêmen bovino criopreservado: por microscopia de contraste de interferência diferencial, pelo uso das sondas LYSO-G e FITC-PNA, pela aplicação de inibidor da protease serina e por imunofluorescência com anticorpos anti-acrosina. Os autores encontraram altas correlações entre as técnicas ($r > 0,85$), sugerindo que qualquer uma das técnicas podem produzir informações similares.

O processo de congelação e descongelação induz a mudanças semelhantes à capacitação ou criocapacitação nos espermatozóides (BAILEY et al., 2000), os danos iniciais associados com a criopreservação parecem suficientes para facilitar e/ou provocar a habilidade dos espermatozóides pós-criopreservação passarem por capacitação funcional (CORMIER; BAILEY, 2003).

Como neste experimento, Oettlé e Soley (1986) também verificaram que a porcentagem de espermatozóides humanos com acrossomo intacto diminui conforme o sêmen

é submetido ao resfriamento e à congelação. Estes autores avaliaram a integridade do acrossomo por duas técnicas diferentes, uma de coloração em microscopia óptica e outra por microscopia eletrônica e encontraram valores semelhantes entre as técnicas para sêmen fresco a 32°C (81 x 79%), sêmen diluído, resfriado e equilibrado a 5°C (70 x 63%) e sêmen pós-congelação (32 x 38%) de espermatozóide com acrossomo intacto.

Semelhantemente, Petrunkina et al. (2005) encontraram mudanças funcionais na membrana plasmática de espermatozóides de cães com a criopreservação pelo monitoramento do volume celular e integridade do acrossomo, verificaram ainda, que a adição de Equex STM ao diluidor antes da criopreservação protege a função regulatória do volume celular e resulta em menor desestabilização da membrana plasmática e degeneração acrossômica.

A queda na porcentagem de função mitocondrial para sêmen criopreservado com Bioxcell® foi de 59,9% e com Botu-Bov® foi de 52,9%. Resultados acima dos observados por O'Connell et al. (2002) que observaram queda de 36 a 47% na função mitocondrial, avaliada por R123, após a criopreservação do sêmen humano.

Apesar da grande diminuição da porcentagem de espermatozóides com alto potencial de membrana mitocondrial após a criopreservação, detectada pelo JC-1, foram obtidos $16,96 \pm 1,03$ (Bioxcell®) e $23,96 \pm 1,06\%$ (Botu-Bov®) de espermatozóides com alto potencial de membrana mitocondrial, resultados melhores do que aqueles observados por Thomas et al. (1998), que notaram apenas 0,9% dos espermatozóides com fluorescência laranja-avermelhada após a criopreservação. Todavia, estes autores utilizaram a citometria de fluxo para fazer a leitura das amostras e notaram que a intensidade de fluorescência foi menor quando o sêmen criopreservado foi avaliado, notando dificuldade em distinguir as populações coradas em vermelho por JC-1 ou por PI.

Esta diminuição na intensidade da fluorescência, descrita por Thomas et al. (1998) também foi notada neste trabalho, assim foram estabelecidas alterações na metodologia para

superar estas dificuldades. Foi notado que o diluidor do sêmen interfere na emissão da fluorescência, pois após a centrifugação (extraíndo-se o diluidor) as células apresentaram-se com boa emissão de fluorescência, no entanto, a adição de um procedimento de centrifugação após a criopreservação poderia causar danos às células que não seriam inerentes ao processo de congelamento, prejudicando os resultados do trabalho. Alguns testes foram realizados para encontrar a melhor maneira de suprimir os efeitos indesejados. Assim, uma maior diluição do sêmen pós-congelamento foi feita em TALP e o aumento da concentração de JC-1 foi estabelecida, estas mudanças no protocolo foram testadas com resultados satisfatórios já que o mascaramento das células coradas foi superado.

A melhor preservação das membranas plasmática e acrossomal e a função mitocondrial observada para o Botu-Bov[®], vêm constatar que a interação dos componentes dos diluidores com o sêmen é fundamental na proteção de certos compartimentos celulares como revisado por Watson (1995), o que reforça a idéia que ainda há muito o que se estudar para encontrar a constituição perfeita dos diluidores, acompanhada das curvas ideais de resfriamento, congelamento e descongelamento, buscando alcançar o ponto de proteção máxima para as diferentes estruturas celulares.

Os efeitos dos constituintes dos diluidores sobre diferentes compartimentos da célula espermática foram observados neste experimento, uma vez que diluidores com constituintes diferentes promoveram proteção variada às diferentes estruturas, estando de acordo com as observações de Garner et al. (1999), as quais indicaram que o glicerol age de forma diferente sobre as estruturas espermáticas.

Thomas et al. (1998) relataram que a criopreservação do sêmen bovino resultou no aumento de células com membrana plasmática lesada, coradas por PI, e diminuição das células com alto potencial de membrana mitocondrial, coradas de laranja-avermelhada pelo

JC-1. Os autores ainda verificaram que a intensidade da fluorescência emitida pelo PI e JC-1 diminui após a criopreservação.

A categoria de células que apresentam membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e função mitocondrial (PIAIC) reflete de forma mais direta a porcentagem de células “viáveis” na amostra. Forero-Gonzalez (2004) encontrou índices de 14,82 e 15,83% de células PIAIC após a criopreservação do sêmen bovino com diluidor tris-gema com glicerol. Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho (Bioxcell[®] = $11,19 \pm 0,90$ e Botu-Bov[®] = $20,80 \pm 1,03\%$). Este achado atenta à grande questão do quanto o processo de criopreservação, apesar dos avanços no desenvolvimento de diluidores e curvas de resfriamento e congelamento, ainda causa lesão em um grande número de estruturas celulares.

Estes valores foram inferiores aos encontrados por De Leeuw et al. (1991) que avaliaram simultaneamente membrana plasmática e acrossomo em espermatozóides bovinos criopreservados, mas não avaliaram função mitocondrial. Estes autores obtiveram percentuais que variaram de 35,3 a 62,0% dos espermatozóides com membrana plasmática intacta e acrossomo intacto, ao passo que Arruda (2000), pesquisando as mesmas variáveis, encontrou percentuais de células com membrana plasmática intacta e acrossomo intacto que variaram de 18,0 a 25,8% por citometria de fluxo e por microscopia de epifluorescência foi de 41,9 a 47,5% entre diluidores.

Estes danos podem ser causados, principalmente, pela formação de cristais de gelo e exposição a alta e baixa concentração de solutos, em que cada estrutura celular é submetida de forma heterogênea com probabilidades casualizadas em se posicionar adequadamente nos canais de diluidor descongelado durante o processo da criopreservação (HOLT, 2000).

O índice de células na categoria de membrana plasmática intacta, com acrossomo lesado, com função mitocondrial (PIALC) ou sem função mitocondrial (PIALS) observado neste experimento (figura 27) foi inferior a 0,5%. Este valor foi similar ao encontrado por

Forero-Gonzalez (2004) após a criopreservação do sêmen bovino e avaliação pela associação de PI, FITC-PSA e MITO. Este fato pode sugerir que a lesão do acrossomo ou mesmo a ocorrência de um processo semelhante a capacitação espermática, pode ser seguida pela permeabilização da membrana plasmática, ou seja, o período de tempo que a célula permanece com a membrana plasmática intacta ou impermeável ao PI é bastante curto, tornando este um achado raro. De Leeuw et al. (1991) também encontraram valores que variaram de 0,0 a 0,2% para espermatozóides criopreservados bovinos com membrana plasmática lesada e acrossomo lesado.

Estas alterações que ocorrem nas membranas dos espermatozóides bovinos após a criopreservação também foram estudadas por Nagy et al. (2003) que associaram PE-PNA, SYBR-14 e PI para avaliar integridade de acrossomo e de membrana plasmática de espermatozóides criopreservados de bovinos. Foram encontradas uma porção da população corada por ambos, SYBR-14 e PI, o que consideraram como um indício de que a célula estaria morrendo. Estes autores notaram que estas células apareciam negativas ao PE-PNA, ou seja, com acrossomo intacto, sugerindo que a lesão do acrossomo deve ocorrer por mudanças degenerativas e necróticas da membrana. Mais tarde, Nagy et al. (2004) para analisar estas mudanças degenerativas e necróticas da membrana, que conduz à perda do acrossomo e morte celular, em sub-populações de espermatozóides criopreservados de bovinos, realizaram avaliações repetidas a cada 30 minutos das amostras de sêmen coradas por PE-PNA, SYBR-14 e PI e incubadas por 4 horas (37° C). Estes pesquisadores observaram que imediatamente após a descongelação quase todos os espermatozóides que estavam morrendo apresentavam o acrossomo intacto e, com o decorrer do tempo de incubação, houve um número crescente de espermatozóides mortos, seguido da deterioração do acrossomo. Estes achados podem explicar os resultados encontrados neste experimento para os espermatozóides nas diferentes categorias.

Após a lesão da membrana plasmática, a homeostase celular é perdida e começam a ocorrer fenômenos que conduzem a morte celular, por isso, corantes que identificam integridade de membrana plasmática são denominados corantes supra-vitais (SIDHU et al., 1992). Neste raciocínio, fica mais fácil entender porque este experimento resultou em baixos índices (<5,0%) de células com membrana plasmática lesada e com função mitocondrial, sejam elas com acrossomo intacto ou lesado (PLAIC e PLALC), como visualizado na figura 28. O oposto também foi verdadeiro, sendo que a maior parte das células com membrana plasmática lesada apresentou-se sem função mitocondrial (PLAIS e PLALS, figura 29).

Apesar do sêmen criopreservado com diluidor Botu-Bov[®] apresentar maior percentual de membrana plasmática intacta e com função mitocondrial do que o sêmen criopreservado com o Bioxcell[®] (figura 24), o percentual de membrana plasmática lesada com função mitocondrial é maior com Bioxcell[®] (figura 28). Este resultado pode indicar que estas células estão numa fase de transição, isto é, já perderam a integridade da membrana plasmática, mas a função mitocondrial ainda não foi afetada. Analisando dessa forma, supõe-se que se estas amostras forem mantidas incubadas a 37°C por um período de tempo, como descrito por Valcárcel et al. (1994), que avaliaram motilidade e integridade de membrana plasmática, o processo seguinte à perda da integridade da membrana plasmática, poderia ser a perda da função mitocondrial e da motilidade.

Como neste experimento, Karabinus et al. (1991) também observaram diferenças entre diluidores, para integridade da membrana plasmática, detectada por PI, e função mitocondrial, avaliada por R123 em espermatozóides bovinos após a criopreservação. Estes autores notaram resultados divergentes quanto a integridade da membrana plasmática, função mitocondrial e a motilidade no sêmen criopreservado com diferentes composições de leite e/ou gema de ovo. Foram encontrados maior percentual de função mitocondrial e menor lesão de membrana plasmática para sêmen congelado em diluidor contendo gema de ovo em

relação ao diluidor à base de leite. Entretanto, os resultados de motilidade foram inversos, ou seja, maior motilidade foi observada para sêmen diluído com leite do que com gema de ovo.

Como descrito por Watson (1995), uma teoria mais bem elaborada sobre a ruptura da membrana plasmática que ocorre devido a criopreservação ainda é necessária, considerando a característica de cada estrutura e sua predisposição aos efeitos das mudanças de temperatura e da osmolaridade do meio.

7.2.4 EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A CROMATINA ESPERMÁTICA

O aumento no percentual de danos na estrutura da cromatina após a criopreservação, foi encontrado somente quando o sêmen foi diluído com Botu-Bov[®], apesar de ter sido estatisticamente comprovado, a porcentagem desse aumento foi muito baixa ($1,23 \pm 0,11\%$) neste diluidor. De acordo com Bochenek et al. (2001), que afirmaram existir correlação negativa significativa ($r = -0,50$) entre danos na estrutura da cromatina e fertilidade de sêmen criopreservado de touros, percentuais de 1,2 a 3,0% de danos na cromatina foram encontrados em touros altamente férteis, ou seja, o aumento provocado pela criopreservação com Botu-Bov[®], neste trabalho, não atingiu um percentual que afetasse a taxa de fertilização.

Januskauskas et al. (2003) verificaram que mudanças na membrana podem estar relacionadas a danos do DNA após a criopreservação do sêmen bovino, pois encontraram correlação altamente significativa ($P < 0,001$) entre porcentagem de células com desnaturação do DNA, mensurada pela acridina laranja, e células com ambas, membrana plasmática lesada (corada por PI) e em apoptose (coradas com anexina V).

A não observação de danos na cromatina após a criopreservação com o diluidor Bioxcell[®] vem confirmar as observações de Watson (1995) de que o núcleo espermático é uma estrutura estável, menos afetada pela criopreservação. Corroborando estas observações

Duty et al. (2002) verificaram que a criopreservação do sêmen humano não afeta a integridade da cromatina, mesmo em congelação rápida sem crioprotetor, indicando a congelação como uma forma de conservar amostra de sêmen para submetê-la à análise do DNA pelo ensaio cometa. Controversamente, Anzar et al. (2002) observaram que a criopreservação do sêmen bovino causa fragmentação nos espermatozóides, sobrecondensação do DNA espermático e apoptose espermática, com translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o externo da membrana plasmática. Todas essas mudanças contribuíram para o declínio geral da fertilidade que foi encontrada nas amostras de sêmen após a criopreservação. Boquet et al. (1999) também observaram que o processo de congelação e descongelação induz a modificações na cromatina de espermatozóides eqüinos.

O percentual de células apresentando lesão na cromatina após a criopreservação foi mais baixo do que o observado na literatura. Bochenek et al. (2001) encontraram uma variação de 2,1 a 23,8% de células com DNA desnaturado; enquanto, Januskauskas et al. (2003) encontraram média de $2,6 \pm 1,55\%$ (estendendo-se de 1,17 a 7,5%), mesmo assim, observaram correlações significativas com fertilidade, ambas entre touros ($r = -0,51$) e entre as partidas ($r = -0,33$).

Apesar de neste experimento não ter sido encontrado efeitos dos diluidores sobre a estrutura da cromatina espermática, Karabinus et al. (1991) afirmaram que a desnaturação da cromatina pela criopreservação é influenciada pelo diluidor. Estes autores demonstraram efeitos diferenciados sobre a qualidade do sêmen pós-descongelação e indicaram que a alteração da composição do diluidor ou seqüência de adição dos componentes dos diluidores pode melhorar a qualidade pós-descongelação do sêmen criopreservado de bovinos. Os autores verificaram maior proteção à cromatina pela gema de ovo do que pelo leite.

7.2.5 CORRELAÇÕES

As correlações observadas neste experimento entre motilidade subjetiva ou por sistema computadorizado e as características de integridade de membrana plasmática e função mitocondrial também são descritas na literatura. Casey et al. (1993) verificaram correlações positivas entre viabilidade espermática, detectada por H258 com motilidade subjetiva ($r=0,88$), motilidade detectada pelo CASA ($r=0,75$), e função mitocondrial detectada pela R123 ($r=0,99$).

Conforme dito anteriormente, todos os testes laboratoriais são desenvolvidos no sentido de se encontrar uma técnica que apresente um alto grau de eficiência e que forneça elementos que torne possível prever a fertilidade de uma partida de sêmen. A biotecnologia do sêmen vem passando por grandes progressos, com técnicas mais precisas e apuradas para a avaliação espermática, com as quais é possível detectar alterações nas diferentes estruturas da célula, identificar o acrossomo sexual (SCHENK et al., 1999), além de avaliar com cálculos precisos de um sistema computacional o movimento de cada espermatozóide da amostra. Contudo, o processo de criopreservação, que teve seu início, de forma mais marcante a partir de 1949, ainda inspira por melhoras, que podem ser viabilizadas com mais pesquisas que relacione esses resultados obtidos em laboratório com testes de fertilidade conduzidos a campo.

8 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos, dentro das condições de realização deste experimento, conclui-se que:

1. A avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial pode ser realizada por técnicas simples e de alta repetibilidade pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e MITO ou PI, FITC-PSA e CMXRos ou PI, FITC-PSA e JC-1, sendo que esta última apresenta a vantagem de separar duas populações de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial.
2. A criopreservação do sêmen bovino causa:
 - a. Diminuição da motilidade e do vigor espermáticos estimados visualmente e da motilidade (total, progressiva, VAP, VSL, VCL e ALH) avaliada por sistema computadorizado.
 - b. Diminuição da integridade das membranas plasmática e acrossomal e redução da função mitocondrial dos espermatozóides.
 - c. Aumento do percentual de alterações morfológicas espermáticas, tanto de defeitos de acrossomo, defeitos maiores e defeitos totais.

3. Diluidores com formulações diferentes atuam de forma distinta na proteção dos diversos compartimentos celulares durante a criopreservação:
 - a. O diluidor Botu-Bovi[®] preserva melhor a motilidade espermática estimada tanto visualmente como por sistema computadorizado pós-descongelação do que o diluidor Bioxcell[®].
 - b. O diluidor Bioxcell[®] mantém mais altas as velocidades de trajeto (VAP), progressiva (VSL) e curvilínea (VCL) estimadas por sistema computadorizada do que o diluidor Botu-Bov[®].
 - c. Espermatozóides criopreservados com o diluidor Botu-Bov[®] apresentam menor deslocamento lateral de cabeça (ALH) e mais alta frequência de batimentos (BCF) do que com o diluidor Bioxcell[®].
 - d. A STR e a LIN são mais altas em espermatozóides criopreservados com Botu-Bov[®] do que com Bioxcell[®].
 - e. O diluidor Botu-Bov[®] promove maior proteção às membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides bovinos criopreservados do que o diluidor Bioxcell[®].
4. Existem correlações entre motilidade e integridade de membrana plasmática e entre motilidade e função mitocondrial em espermatozóides bovinos criopreservados.

REFERÊNCIAS

- ALBERTI, K.; CARMO, M.T.; OBA, E.; MENDONÇA, A.L.Z.; SOUZA, D.B.; DELL'AQUA JR., J.A.; VIANNA, F.P.; PAPA, F.O. Eficiência de novo diluente na congelabilidade de sêmen bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32 (Suplemento), p. 176, 2004.
- ALM, K.; TAPONEN, J.; DAHLBOM, M.; TUUNAINEN, E.; KOSKINEN, E.; ANDRESSON, M. A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. *Theriogenology*, v. 56, p. 677-684, 2001.
- ALVARENGA, M.A. *Melhoria da resistência espermática à congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para semen de garanhões*. Tese (livre-docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Paulista do Estado de São Paulo, Botucatu, SP, 2002. 87 p.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, v. 7, p. 145-173, 1987.
- AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNAAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COUNTERS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl[®], a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, v. 61, p. 895-907, 2004.
- ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M.M.; KROETSCH, T.G.; PAULS, K.P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 354-360, 2002.
- ARRUDA, R.P. *Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)*. Tese de Livre Docência, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2000. 121 p.
- ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozóides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 228-229, 2003b.
- ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozóides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 226-227, 2003a.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; GARCIA, A.R.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; SOUZA, L.W.O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada,

1. Londrina, PR. 2004. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004. p. 166-179.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; SOUZA, L.W.O.; REBELATTO, F.L. Novas técnicas para a avaliação do sêmen de garanhões. *In: SIMPÓSIO MERIAL DE EQUINOCULTURA*, 1., Porto Alegre, RS. 16 de julho de 2003. p. 18-28, 2003c.

ARRUDA, R.P.; SOUZA, N.L.; MARQUES, A.; CELEGHINI, E.C.C.; GOBESSO, A.A.O.; MEIRELLES, F.V.; BINELLI, M.; BLASQUES, F.J.H. Evaluation of techniques using CFDA/PI, H258/FITC-PSA and TRYPAN BLUE/GIEMSA for assessment of the viability and acrosomal integrity of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 477, 2002.

BACCETTI, B.; GAMBERA, L.; MORETTI, E; PIOMBONI, P. A quick molecular method for simultaneous detection in spermatozoa of nuclear, acrosomal and axonemal structure by fluorescent microscopy. *Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology*, v. 31, n. 4, p. 563-569, 1999.

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

BAYYARI, G.R.; COOK, J.R.; HARRIS Jr, G.C.; MACY, L.B.; SLAVICK, M.F.; SKEELES, J.K. Research note: The evaluation of chicken spermatozoa using fluorescent staining in a 96-well format. *Poultry Science*, v. 69, p. 1602-1605, 1990.

BAVISTER, B.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biology of Reproduction*, v. 28, n. 1, p. 235-47, 1983.

BENEL, L.; RNOT, X.; KORPROBST, M; ADOLPHE, M.; MOUNOLOU, J.C. Mitochondrial uptake of rhodamine 123 by rabbit articular chondrocytes. *Cytometry*, v. 7, p. 281-285, 1986.

BEREITER-HAHN, J. Behavior of mitochondria in the living cell. *International Review of Cytology*, v. 122, p. 1-63, 1990.

BILGILI, S.F.; RENDEN, J.A. Fluorimetric determination of avian sperm viability and concentration. *Poultry Science*, v. 63, n. 11, p. 2275-77, 1984.

BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*, v. 56, p. 557-567, 2001.

BOQUET, M.; SPIRITO, S.; GIULIANO, S.; NEILD, D.; CHAVES, G.; AGÜERO, A.; PAZ, D.; FERRARI, M. Efectos de la criopreservación sobre la cromatina de espermatozoides equinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, n. 3, 1999.

BRAUNDMEIER, A.G.; MILLER, D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 1915-1925, 2001.

BRINKLEY, W.B.R. Microtubules: a brief historical perspective. *Journal of Structural Biology*, v. 118, p. 84-86, 1997.

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*, v. 60, p. 1539-1551, 2003.

CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBINS, E.Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *Journal of Andrology*, v. 14, n. 4, p. 289-297, 1993.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15. Porto Seguro, BA. 08 a 12 de agosto de 2004. p. 511.

CENTOLA, G.M.; MATTOX, J.H.; BURDE, S.; LEARY, J.F. Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. *Molecular of Reproduction and Development*, v 27, n. 2, p. 130-135, 1990.

COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M. Avaliação da integridade de membrana plasmática dos espermatozoides de bovinos, através de corantes fluorescentes e sua relação com a motilidade progressiva. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 19, n. 3-4, p. 173-180, 1995.

CORMIER, N.; BAILEY, J. A differential mechanism is involved during heparin -and cryopreservation -induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 69, p. 177-185, 2003.

COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G.; FRANCESCHI, C. A new method for the cytometric analysis of mitochondrial membrane potencial using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 197, n. 1, p. 40-45, 1993.

COTTORELLO, A.C.P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelamento e avaliação do semen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 26, n. 1, p. 14-25, 2002.

COSSON, J. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. *Cell Biology International*, v. 20, n. 2, p. 83-94, 1996.

COUNTERS, J. L.; EKWALL, H.; PAQUIGNON, M. PLOEN, L. Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 87, p. 613-26, 1989.

CRISTANELLI, M.J.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 24, n. 6, p. 681-686, 1985.

CROSS, N.L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction*, v. 41, p. 635-641, 1989.

CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detecting acrosome - reacted human sperm. *Gamete Research*, v. 15, p. 213-226, 1986.

- CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 5, p. 46-52, 2000.
- DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; WOELDERS, H. The fix vital stain method: simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *Journal of Andrology*, v. 12, n. 2, p. 112-118, 1991.
- DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, H.G.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v. 30, p. 32-44, 1993
- DIAZ-PERES, E.; THOMAS, P.; MEIZEL, S. Evidence suggesting a role for sperm methalloendoprotease activity in penetration of zone-free hamster eggs by human sperm. *Journal of Experimental Zoological*, v. 248, p. 213-221, 1988.
- DONNELLY, E.; O'CORNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S.E. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Human Reproduction*, v. 15, n. 7, p. 1552-1561, 2000.
- DUCHEN, M.R.; CROMPTON, M.; PEUCHEN, S.; NOWICKY, A. The use of a carbocyanine dye, JC-1, to monitor changes of mitochondrial potential in isolated mammalian cells. *Journal of Physiology*, v. 473, p.7, 1993.
- DUTY, S.M.; SINGH, N.P.; RYAN, L.; CHEN, Z.; LEWIS, C.; HUANG, T.; HAUSER, R. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Human Reproduction*, v. 17, n. 5, p. 1274-1280, 2002.
- EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. *The physiology of reproduction*. cap. 2, p. 29-77. New York: Raven Press. 1994.
- ELEVITCH, F.R. *Fluorometric techniques in clinical chemistry*. Copyright: Little, Brown and Company – Boston. 1973. 327 p.
- ERNSTER, L.; SCHATZ, G. Mitochondria: a historical review. *The Journal of Cell Biology*, v. 91, n. 3, p. 227s-255s, 1981.
- EVENSON, D.P. Flow cytometry evaluation of male germ cells. In: YEN, A. (Ed.) *Flow Cytometry: advanced research and clinical applications*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1980, p.217-46.
- EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R.; Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, v. 210, p. 1131-33, 1980.
- FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Assessment of *Psium sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, v. 32, p. 23-27, 1992.
- FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOT, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, v. 49, p. 871-879, 1998.

- FISER; P.S.; FAIRFULL, R.W. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa. *Cryobiology*, n. 21, p. 542-551, 1984.
- FISER; P.S.; AINSWORTH, L.; FAIRFULL, R. W. Cryosurvival of ram spermatozoa in hypertonic and isotonic diluents. *Canadian Journal of Animal Science*, n. 62, p. 425-428, 1982.
- FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1469, p. 197-235, 2000.
- FORERO-GONZALEZ, R.A. *Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino*. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Pirassununga, 2004. 92 p.
- FOSSA, S.D.; DE ANGELIS, P.; KRAGGERUD, S.M.; EVENSON, D.; THEODORSEN, L.; CLAUSEN, O.P. Prediction of posttreatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Cytometry*, v. 30, n. 4, p. 192-96, 1997.
- FRASER, L. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. *Polish Journal of Veterinary Science*, v. 7, n. 4, p. 311-321, 2004.
- FREY, T.G.; MANNELLA, C.A. The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Science*, v. 25, n. 7, p. 319-324, 2000.
- GARNER, D.L.; JOHNSON, L. A.; ALLEN, C.H. Fluorimetric evaluation of criopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. *Theriogenology*, v.30, p.369-378, 1988.
- GARNER, D.L.; PINKEL, D.P.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. *Biology of Reproduction*, v. 34, p. 127-138, 1986.
- GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reproduction in the Domestic Animal*, v. 34, p. 399-404, 1999.
- GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; GRAVANCE, C.G.; MARSHALL, C.E.; DEJARNETTE, J.M.; ALLEN, C.H. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*, v. 56, p. 31-40, 2001.
- GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; 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. 1401-06, 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.
- GILMORE, J. A.; LIU, J.; WOODS, E. J.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. Crioprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal criopreservations methods. *Human Reproduction*, v. 15, n. 2, p. 335-343, 2000.

- GLEDHILL, B.L.; DARZYNKIEWICZ, Z.; RINGERTZ, N.R. Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull: increased [³H]actinomycin D binding to nuclear chromatin of morphologically abnormal spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 26, p. 25, 1971.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, v. 43, p. 55-64, 1990.
- GRAHAM, J.K. Response of spermatozoa to freezing. In: Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa. 1995. *Proceedings*. Equine Sciences. Colorado State University Fort Collins, Colorado, USA. p.83-95.
- GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, v. 53, n.9, p. 1.691-1.703, 2000.
- GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; MILLER, M.G.; BERGER, T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reproductive Toxicology*, v. 15, p. 5-10, 2001.
- GRAVANCE, C.G.; VISHWANATH, R.; PITTY, C.; CASEY, P.J. computer aumated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology*, v. 46, p. 1205-1215, 1996.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7. ed. Barueri, SP: Manole, 2004. 513 p.
- HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNENSACK, R. Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullenejakulaten. *Archiev Exper Vet med, Leipzig*, v. 38, n. 1, p. 105-114, 1984.
- HAMAMAH, S.; ROYERE, D.; NICOLLE, J.C.; PAQUIGNON, M.; LANSAC, J. Effects of freezing-thawing on the spermatozoa nucleus: a chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reproduction Nutrition and Developments*, v. 30, p. 59-64, 1990.
- HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of Andrology*, n.11, p. 73-88, 1990.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 88, p. 343-352, 1990.
- HAUGLAND, R.P. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. Molecular Porbes, 2001.
- HENLEY, N.; BARON, C.; ROBERTS, K.D. Flow cytometric evaluation of the acrosome reaction of human spermatozoa: a new method using a photoactivated supravital stain. *International Journal of Andrology*, v. 17, n. 2, p. 78-84, 1994.
- HOLDEN, C.A.; ROSS, V.H.; SATHANANTHAN, A.H.; TROUNSON, A.O. Assessment of the human sperm acrosome reaction using concavalian A lectin. *Molecular Reproduction and Development*, v. 25, p. 247-257, 1990.

- HOLT, W.V. Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. *International Review of Cytology*, v. 87, p. 159-194, 1984.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 3-22, 2000.
- HUO, L.J.; MA, X.H.; YANG, Z.M. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology*, v. 58, p. 1349-1360, 2002.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology*, v. 55, p. 947-961, 2001.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, v. 60, p. 743-758, 2003.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars Veterinaria*, v. 10, p. 156-65, 1994.
- JONES, R.T.; MARTIN, I.C.A. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 35, p. 311-320, 1973.
- KARABINUS, D.S.; EVENSON, D.P.; KAPROTH, M.T. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 11, p. 3836-48, 1991.
- LAGARES, M.A.; MEIRELLES, L.S.; WALD, V.B.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Efeitos de diferentes diluidores sobre a membrana plasmática do espermatozóide equino resfriado. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 7, n. 3, p. 153-156, 2000.
- MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; LUCIDI, P.; SEREN, E. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chortetracycline staining. *Theriogenology*, v. 45, p. 373-381, 1996.
- MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction of Fertility and Development*, v. 8, p. 1165-1178, 1997.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, v. 247, p. C125-C142, 1984.
- MEDEIROS, A.S.L. *Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2003. 96 p.
- MEDEIROS, C.M.O.; FORRELL, 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.

MEIRELLES, L.S.; LAGARES, M.A.; BRITO, E.L.R.; SILVEIRA, G.B.; CONCEIÇÃO, T.R.; BAHNIUK, M.C.; MORAES, I.A.; PABST, C.U.; GREGORY, R.M.; GARBADE, P.; MATTOS, R.C. Efeito de diluentes à base de leite desnatado de diversas osmolaridades na preservação do sêmen eqüino resfriado. *Arquivo da Faculdade de Veterinária*, UFRGS, v. 27, n. 2, p. 52-59, 1999.

MENDOZA, C.; CARRERAS, A.; MOOS, J.; TESARIK, J. Distinction between true acrossome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 95, p. 755-763, 1992.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Dados Estatísticos. Comércio Exterior Brasileiro. Exportações – Principais produtos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/COMERCIO_EXTERIOR_BRASILEIRO>. Acesso em: 30 set. 2004.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update*, v. 3, n.5, p. 403-439, 1997.

MRUK, D.D.; CHENG, C.Y. Sertoli-sertoli cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, v. 25, n. 5, p. 747-806, 2004.

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.

NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNINSSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, v. 80, p. 225-235, 2004.

NATH, J. Correlative biochemical and ultrastructural studies on the mechanism of freezing damage to ram semen. *Cryobiology*, v. 9, p. 240-246, 1972.

NAVARA, C.S.; SIMERLY, C.; ZORAM, S.; SCHATTEN, G. The sperm centrosome during fertilization in mammals: implications for fertility and reproduction. *Reproduction and Fertility of Development*, v. 7, p. 745-54, 1995.

NEVES NETO, J.R.; FERNANDES, C.B.; LANDIN-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F.O. Avaliação estrutural e funcional da célula espermática eqüina frente a diferentes substâncias crioprotetoras. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32 (Suplemento), p. 175, 2004.

NRC, National Research Council. Nutrient requirements of dairy cattle, 7. ed. Washington DC: National Academic of Science. p. 385, 2001.

O'CONNELL, M.; MCCLURE, M.; LEWIS, S.E.M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, v. 17, n. 3, p. 704-779, 2002.

OETTLÉ, E.E.; SOLEY, J.T. Ultrastructural changes in the acrosome of human sperm during freezing and thawed: a pilot trial. *Archives of Andrology*, v. 17, p. 145-150, 1986.

- OMBELET, W.; MENKVELD, R.; KRUGER, T.F.; STEENO, O. Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Human Reproduction*, v. 1, n. 6, p. 543-557, 1995.
- ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. *International Review of Cytology*, v. 122, p. 105-151, 1990.
- PALENCIA, D.D.; GARNER, D.L.; HUDIG, D.; HOLCOMBE, D.N.; BURNER, C.A.; REDELMAN, D.; FERNANDEZ, G.C.J.; ABUELYAMAN, A.S.; KAM, C.M.; POWERS, J.C. Determination of activable proacrosin/acrosin in bovine sperm using an irreversible isocoumarin serine protease inhibitor. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 536-542, 1996.
- PAL, S.K.; MANDAL, D.; BHATTACHARYYA, K. Photophysical process of ethidium bromide in micelles and reverse micelles. *Journal of Physical and Chemical*, v. 102, p. 11017-11023, 1998.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v. 38, p. 209-222, 1992.
- PEÑA, A.L.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Flow cytometric assessment of acrosomal status and viability of dog spermatozoa. *Reproduction of Domestic Animal*, v. 34, p. 495-502, 1999.
- PEÑA, A.L.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology*, v. 50, p. 1211-1220, 1998.
- PEÑA-MARTÍNEZ, A.I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 209-224, 2004.
- PETERSON, R.N.; SILVERSTEIN, K.; FREUND, M. A rapid fluorometric method for the determination of DNA in human semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 41, p. 485-488, 1974.
- 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.
- PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; ROLDAN, E.R.S. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or the eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 118, p. 145-152, 2000.
- POOT, M.; ZHANG, Y.Z.; KRÄMER, J.A.; WELLS, K.S.; JONES, L.J.; HANZEL, D.K.; LUGADE, A.G.; SINGER, V.L.; HAUGLAND, R.P. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 44, n. 12, p. 1363-72, 1996.
- QUINN, P.J.; WHITE, I.G.; CLELAND, K.W. Chemical and ultrastructure changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *Journal Reproduction and Fertility*, v. 18, p. 209-220, 1969.

RAWES, V.Y.; GALAVARNA, G.D.; ACOSTA, A.A.; OLMEDO, S.B.; CHEMES, H.E. Incidence of tail structure distortions associated with dysplasia of the fibrous sheath in human spermatozoa. *Human Reproduction*, v. 16, n. 5, p. 879-886, 2001.

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a corbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, v. 30, p. 4480-4486, 1991.

ROBERTSON, J.D. Membrane structure. *The Journal of Cell Biology*, v. 91, n. 3, p. 189s-204s, 1981.

ROUX, C.; TRIPOGNEY, C.; JOANNE, C.; BRESSON, J.L. Qualité nucléaire du spermatozoïde humains (protéines nucléaires). *Gynécologie Obstétrique e Fertilité*, v. 32, p. 792-798, 2004.

ROYERE, D.; HAMAMAH, S.; NICOLLE, J. C.; LANSAC, J. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. *International Journal of Andrology*, n. 14, p. 328-32, 1991.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, v.38, p.1-36, 1995

SALVIOLI, S.; ARDIZZONI, A.; FRANCESCHI, C; COSSARIZZA, A. JC-1, but not DiOC₆ (3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v. 411, p. 77-82, 1997.

SCHENK, J.L.; SUH, T.K.; CRAN, D.G.; SEIDEL JR.; G.E. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 52, p. 1375-1391, 1999.

SEGOVIA, M.; JENKINS, J.A.; PANIAGUA-CHAVEZ, C.; TIERSCH, T.R. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology*, v.53, p. 1489-1499, 2000.

SIDHU, K.S.; DHINDSA, J.S.; GURAYA, S.S. A simple procedure for detecting the true reaction in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Biotechnic e Histochemistry*, v. 67, n.1, p. 35-39, 1992.

SINGER, S.J.; NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes. *Science*, v. 175, p. 720-31, 1972.

SOUZA, N.L. *Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozoides criopreservados de equinos*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2001. 76 p.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999. 89 p.

- STRAUSS, G.; INGENITO, E.P. Stabilization of liposome bilayers to freezing and thawed: effects of cryoprotective agents and membrane proteins. *Cryobiology*, v. 17, p. 508-515, 1980.
- SUKARDI, S.; CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Animal Reproduction Science*, v. 46, p. 89-96, 1997.
- SZTEIN, J.M.; NOBLE, K.; FARLEY, J.S.; MOBRAATEN, L.E. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, v. 41, p. 28-39, 2001.
- TARESSON, F.; AMIS, D.; SCHINDLER, H. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Journal Reproduction and Fertility*, v. 51, p. 461-462, 1977.
- TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 62, p. 1245-1252, 2004.
- TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertility and Sterility*, v. 42, n. 1, p. 87-91, 1984.
- TESARIK, J.; MENDOZA, C.; CARRERAS, A. Fast acrosome reaction measure: a highly sensitive method for evaluating stimulus-induced acrosome reaction. *Fertility and Sterility*, v. 59, n. 2, p. 424-430, 1993.
- THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, v. 58, n. 3, p. 786-793, 1998.
- THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in Cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 56, p. 991-998, 1997.
- TROIANO, L.; GRANATA, R.M.; COSSARIZZA, A.; KALASHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Experimental Cell Research*, v. 241, p. 384-93, 1998.
- UNANIAN, M.M. **Integridade da cromatina:** método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 21p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 56).
- VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; PÉREZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology*, v. 41, p. 483-89, 1994.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002.

- VIANNA, F.P. *Eficiência dos testes de termorresistência (lento e rápido) em relação a fertilidade de semen congelado na espécie bovina*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2005. 88 p.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 23-53, 2000.
- YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 349-355, 2000.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with Cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60-1, p. 481-492, 2000.
- WAY, A.L.; HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. Comparison of four staining methods for evaluation acrosome status and viability of ejaculate and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology*, v. 43, p. 1301-16, 1995.
- WOJCIK, C.; SAWICKI, W.; MARIANOWSKI, P.; BENCHAI, M.; CZYBA, J.C.; GUERIN, J.F. Cyclodextrin enhances spermicidal effects of magainin-2-amide. *Contraception*, v. 61, p. 99-103, 2000.
- WOLFE, C.A.; JAMES, P.S.; MACKIE, A.R.; LADHA, S.; JONES, R. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 1506-1514, 1998.
- WOOLLEY, D.M.; RICHARDSON, D.W. Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.53, p.389-394, 1978.
- ZAHALSKY, M.P.; ZOLTAN, E.; MEDLEY, N.; NAGLER, H.M. Morphology and the sperm penetration assay. *Fertility and Sterility*, v. 79, n. 1, 2003.
- ZÜGE, R.M. *Avaliação de semen de búfalos congelados em diluidores Tes, Tris e Glicina-gema através do teste de penetração em oócitos zona free de hamster*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 1999. 67 p.

ANEXO 1

TALP (BAVISTER et al., 1983)**1. SOLUÇÃO DE SAIS DO TALP** (para preparar 500mL)**Componentes:**

- NaCl 2,1 g
- KCl 0,935 g
- NaHCO₃ 1,05 g
- NaH₂PO₄ 0,025 g
- CaCl 2H₂O 0,145 g
- MgCl 6H₂O 0,04 g
- Hepes 3,25 g

Preparo:

- Diluir CaCl 2H₂O e MgCl 6H₂O em 200 mL de água destilada
- Diluir os outros sais em 200 mL de água destilada
- Combinar as duas soluções e completar para 500 mL
- Filtrar
- Manter resfriado

2. SOLUÇÃO DOS METABÓLITOS GLICOSADOS**A. SOLUÇÃO ESTOQUE** (para preparar 50 mL)**Componentes:**

- Glicose 2.5 g
- Lactato de Sódio 9.25 mL
- Piruvato de Sódio 70 mg
- Pen-Strep 12.5 ML

Preparo:

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

B. Solução Trabalho

- Colocar 45 mL da Solução de Sais do TALP
- Ajustar o pH para 7,4
- Colocar 5 mL da Solução Estoque dos Metabólitos Glicosados
- Filtrar em filtro de 0,45 µm
- Aliquotar (alíquotas de 300 µL)
- Manter em freezer (-20° C)

3. PREPARO NO DIA**Componentes:**

- 10 mL da Solução de Sais do TALP
- 200 µL da Solução (trabalho) de Metabólitos Glicosados
- 100 mg de soro albumina bovina (BSA)

Preparo:

- Dissolver o BSA em incubador por 10 minutos
- Ajustar o pH para 7,4
- Filtrar em filtro de 0,45 µm

ANEXO 2

HEPES-BSA (THOMAS et al., 1998)

Para preparar 1.000 mL

Componentes:

- NaCl 130 mM 7,6 g
 - KCl4 mM 0,30 g
 - Fructose 14 mM 2,52 g
 - Hepes 10 mM 2,38 g
 - CaCl₂ 2H₂O 1 mM 0,15 g
 - MgCl₂ 6H₂O 0,5 mM 0,04 g
 - BSA 0,1% 1,00 g
-
- NaHCO₃ 28 mM 2,35 g

ANEXO 3

DILUIÇÕES E PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

IODETO DE PROPÍDIO (Sigma-Aldrich, 28,707-5 - 25 mg)

Solução estoque

25 mg de PI + 1 mL de DMSO (25 mg/mL)

SOLUÇÃO TRABALHO (0,5 mg/mL)

20 µL da solução estoque de PI (25 mg/mL) + 980 µL de DPBS

SOLUÇÃO TRABALHO (2 mg/mL)

80 µL da solução estoque de PI (25 mg/mL) + 920 µL de DPBS

Armazenar em freezer, no escuro.

FITC-PSA (FITC-PSA, Sigma, L-0770 – 2 mg)

SOLUÇÃO TRABALHO (100 µg/mL)

2 mg de FITC-PSA + 20 mL de DPBS + 10% de solução de azida de sódio 10%

Aliquotar e Armazenar a 4° C, no escuro

RODAMINA 123 (R123, Molecular Probes, R-302 – 25 mg)

SOLUÇÃO ESTOQUE (DMSO) - 5 mg/mL

SOLUÇÃO TRABALHO (DMSO) - 0,2 mg/mL (0,53 mM)

Armazenar em freezer, no escuro.

MITOTRACKER GREEN FM (MITO, Molecular Probes, M-7514 – 20 x 50 µg)

SOLUÇÃO TRABALHO (DMSO) – 1 mM

Armazenar em freezer, no escuro.

CMXROS (MitoTracker Red[®], Molecular Probes, M-7512 – 20 x 50 µg)

SOLUÇÃO TRABALHO (DMSO) - 500 µM

JC-1 (Molecular Probes, T-3168 – 5 mg)

SOLUÇÃO ESTOQUE (DMSO) - 1,53 mM

SOLUÇÃO TRABALHO (DMSO) - 153 µM

HOECHST 33342 (Molecular Probes, H-1399 – 100 mg)

SOLUÇÃO ESTOQUE (DMSO)

100 mg H342 + 4 mL de DMSO (25 mg/mL)

SOLUÇÃO TRABALHO (DPBS)

1,6 µL da solução estoque (25 mg/mL) + 998,4 µL de DPBS (40 µg/mL)

Aliquotar em 10 µL e armazenar –20° C, no escuro.

ANEXO 4

SETUP – HAMILTON THORNE BIOSCIENCES (Ultimate – Sperm Analyzer)

CARACTERÍSTICA	AJUSTE
Número de imagens adquiridas	30
Taxa de aquisição das imagens	60 Hz
Contraste mínimo da célula	50
Tamanho mínimo da célula	6 pixels
Contraste para células imóveis	30
Retilinearidade (STR), Limiar	60%
Valor de corte de VAP para células lentas	30,0 $\mu\text{m/s}$
VAP mínimo para células progressivas	40,0 $\mu\text{m/s}$
Valor de corte de VSL para células lentas	20,0 $\mu\text{m/s}$
Tamanho da célula	6 pixels
Intensidade da célula	80
Tamanho da cabeça estática	0,23 a 1,91
Intensidade da cabeça estática	0,56 a 1,20
Alongamento estático	8 a 92
Aumento	1,89
Frequência de vídeo	60
Intensidade de iluminação	2203
Temperatura	37° C

ANEXO 5

BIOXCELL® (IMV Technologies, IVP do Brasil)**Composição química por litro:**

- Tris 2,30 g
- Citrato de sódio 6,20 g
- Cloreto de Potássio 0,80 g
- Frutose 1,20 g
- Monohidrato de Lactose 0,80 g
- Glicina 0,20 g
- Glicose Anidra 0,20 g
- Taurina 0,005 g
- Sulfato de Gentamicina 0,24 g
- Tartrate de Tilosina 0,33 g
- Lincospectina 100 0,383 g
- Glicerol 40,20 g
- Hidrato de Cálcio Lactato 0,70 g
- Lecitina de Soja 1,50 g
- Monohidrato de Ácido Cítrico ... 2,50 g
- Água ultra pura 0,065 L

► pH final 6,8 a 7,3

► Osmolaridade final 1.250 a 1.450 mOs/kg H₂O

ANEXO 6

BOTU-BOV[®] (® Biotech-Botucatu-Ltda/ME)

Composição química básica (ALBERTI et al., 2004):

- Açúcares
- Aminoácidos
- Soluções tampões
- OEP (*ovus est paste*)
- Gema de ovo

Constituído pelas Frações I (sem crioprotetor) e II (com crioprotetor)

► Foi preparada uma única fração pela adição de 50% da Fração I + 50% da Fração II