ANDRÉ FURUGEN CESAR DE ANDRADE

Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças
semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em
espermatozóides criopreservados de eqüinos

**São Paulo
2009**

ANDRÉ FURUGEN CESAR DE ANDRADE

**Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças
semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em
espermatozóides criopreservados de eqüinos**

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 Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

São Paulo
2009

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2107
FMVZ

Andrade, André Furugen Cesar de

Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em espermatozoides criopreservados de eqüinos / André Furugen Cesar de Andrade. – São Paulo : A. F. C. Andrade, 2009.

132 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Garanhão. 2. Sêmen congelado. 3. Fosforilação do aminoácido tirosina. 4. Plasma seminal. 5. Citometria de fluxo. I. Título.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Adição do plasma seminal na reversão da criocapacitação e redução da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozóides eqüinos", protocolo nº593/2004, utilizando 06 cavalos, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Addition of seminal plasma in cryocapacitation reversion and reduction of ROS generation in equine sperm", protocol number 593/2004, utilizing 6 horses, 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 "ad referendum", meeting).

São Paulo, 21 de dezembro de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ANDRADE, André Furugen Cesar de

Título: Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em espermatozóides criopreservados de eqüinos

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 Doutor 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: _____

Mais uma vez

*Mas é claro que o sol
Vai voltar amanhã
Mais uma vez, eu sei...
E scuridão já vi pior
De endoiçar gente sã
E spera que o sol já vem...
Nunca deixe que lhe digam:
Que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos
Nunca vão dar certo
Ou que você nunca
Vai ser alguém...
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Mas eu sei que um dia
A gente aprende
Se você quiser alguém
Em quem confiar
Confie em si mesmo!...
Quem acredita
Sempre alcança...*

Renato Russo; Flavio Venturini

DEDICO ESTA TESE,

Aos meus Pais ANTONIO E MITIKO, aos meus Irmãos ALEXANDRE E MARIANA,

AO MEU SOBRINHO PIETHRO E A MINHA AFILHADA FERNANDA

*SE EU TIVE A OPORTUNIDADE DE ESTAR ONDE ESTOU E DE CHEGAR AONDE
CHEGAREI...DEVO AO SACRIFÍCIO, A DEDICAÇÃO E AO AMOR DE VOCÊS...*

OBRIGADO POR COMPREENDEREM E ACEITAREM MINHAS ESCOLHAS

NÃO HÁ UM DIA QUE EU NÃO PENSE EM VOCÊS

AMO MUITO VOCÊS....SEMPRE E PARA SEMPRE...

Ao amigo RUBENS MEU ORIENTADOR E EXEMPLO,

Gostaria de expressar em palavras tudo o que o senhor foi, é e será para minha pessoa, seja como orientador, seja como amigo e espero eu, em um futuro próximo, colega nesta profissão tão fascinante que é ser PROFESSOR.

O senhor me aceitou mesmo sabendo de meus defeitos, mas como EDUCADOR me fez enxergar os ERROS e caminhar ao encontro dos ACERTOS...errei...como errei...e nestes momentos é que eu pude enxergar e contar com o VERDADEIRO Rubens, o homem rígido, muitas vezes rígido até consigo mesmo, mas dono de um CARÁTER E UM CORAÇÃO PRODIGIOSOS.

Um ORIENTADOR que se tornou AMIGO...não por fazer as minhas vontades, por dizer palavras bonitas, me agradar, falar devaneios, elogiar minhas virtudes...mas porque sempre teve a coragem e a dignidade de falar diretamente a mim o que eu deveria ouvir...e principalmente por ter a humildade de escutar e tentar compreender o que eu queria falar.

Termo meu Doutorado agradecendo a DEUS, por ter colocado o senhor em minha vida...pois ao chegar ao fim desta etapa sei de minhas responsabilidades futuras mas não as temo, pois tenho certeza de ter tido minha carreira LAPIDADA PELO MELHOR ARTESÃO.

A preocupação com a formação profissional de cada aluno que aqui passa deveria ser seguido como REGRA por todos os seus pares...acabo meu doutorado com a certeza de ter feito a escolha certa....pois o senhor não apenas me formou PESQUISADOR, o senhor dia a dia se preocupou em eu ser um melhor MÉDICO VETERINÁRIO, um melhor PROFESSOR...sem nunca ter deixado eu esquecer de SER HUMANO.

Eu nunca esquecerei o que o senhor fez e faz por mim e pelas pessoas que eu amo...o senhor sempre se doou mais do que a vossa profissão exige.....SEREI GRATO ETERNAMENTE!!!

Confesso que o texto abaixo não é de minha autoria, mas resume muito do que sinto pelo senhor.

*A IMORTALIDADE QUE REVESTE A NATUREZA HUMANA FAZ O HOMEM SEMPRE PRESENTE. PRESENTE PELO CONHECIMENTO QUE TRANSMITIU. PRESENTE PELA AMIZADE QUE CONQUISTOU. PRESENTE PELO EXEMPLO QUE LEGOU.
MUITO OBRIGADO POR TUDO, PELAS OPORTUNIDADES, PELA AMIZADE, PELOS CONSELHOS E ATÉ PELAS AULAS DE FUTEBOL....*

À amiga ENEIVA CARLA (CARLINHA),

*PELA AMIZADE, PELO EXEMPLO, POR SER QUEM ELA É...OBRIGADO POR
TUDO!!!*

TENHO MUITA SORTE E ORGULHO DE PODER TE CHAMAR DE AMIGA.

*Talvez nem mesmo você saiba o quanto já me ajudou...obrigado por ter ACREDITADO em
mim!!!!*

A minha Amada SIMONE,

Devo ser uma daquelas pessoas abençoadas por nosso DEUS, pois só assim para explicar e compreender o porquê de você em minha vida...

Você surgiu em minha vida de um modo inesperado...

Você tornou-se meu ALICERCE,

Meu ACONCHEGO...

Meu ORGULHO

Minha RAZÃO DE VIDA.

A minha Companheira por muitas vezes solitária.

Ajuda-me nos momentos que mais necessito

Faz-me SORRIR nos momentos que CHORO

Faz-me ver que a VIDA é um PRESENTE

PORQUE PRESENTE NELA VOCÊ ESTÁ.

*OBRIGADO POR EXISTIR, EU NUNCA SEREI DIGNO E CAPAZ DE
RETRIBUIR O QUE VOCÊ FAZ POR MIM....MEU AMOR!!!*

AGRADECIMENTOS

***À DEUS**, por me permitir chegar até aqui e colocar pessoas tão especiais no meu caminho.*

*À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** por permitir a realização de um dos meus principais sonhos.*

*Ao **Professor Dr. Wilson Roberto Fernandes** por ter me colocado em contato com o ser Cavalos. O senhor através de sua sabedoria e paciência me mostrou que eu era capaz de trabalhar com eles. Por nunca ter tido contato antes da faculdade achava que isto seria um grande obstáculo a ser transposto, até o senhor me apresentar a “eles”. Obrigado, pois muito do que sou devo ao senhor.*

*Ao **Professor Dr. Aleksanders Spers**, pelos conselhos de vida, e por ele ter dado a chance de eu sonhar em ser pesquisador...*

*Ao **Professor Dr. Mário Binelli** que permitiu o meu primeiro contato com o fascínio chamado Ciência...*

*Ao **Professor Dr. Ed Hoffman Madureira** pelos ensinamentos passados em forma de agradáveis conversas, e pela ajuda nos momentos em que seu conhecimento de Bioquímica e Farmacologia foram imprescindíveis.*

*A **Professora Annelise de Souza Traldi** pela convivência, pelos queijos e principalmente pelo meu conhecimento adquirido no tocante reprodução de pequenos ruminantes, guardo-os comigo.*

*Ao Professor **Anibal Sant’Anna Moretti**, por tudo que ele representa em minha vida. Pelos conselhos e pela amizade ao longo dos anos....e talvez ele não se lembre, mas pelo primeiro estágio de minha vida....que foi na granja de suínos....*

*Ao **Departamento de Reprodução Animal** pela oportunidade de fazer parte desta benemérita instituição*

*Aos Professores do Departamento de Reprodução Animal com quem pude além de conviver, granjear conhecimentos que foram e serão importantes em toda a minha vida profissional...**Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, Prof. Dr. José Antonio Visintin, Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe, Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe, Profa. Dra. Clair Motos de***

Oliveira, Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi, Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção e ao Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira....muito obrigado!

Ao Professor Frederico Ozanam Papa, pela hospitalidade e disponibilidade em nos receber em vossa instituição.

Ao Professor Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, por me ensinar a gostar e a trabalhar com uma ferramenta que é fundamental em tudo que eu faço...obrigado por ter sido tão bom Professor, pois só os bons educadores conseguem transformar algo abstrato em concreto.

Ao Professor Dr. Flávio Vieira Meirelles pela ajuda e disponibilidade do laboratório em partes fundamentais desta pesquisa.

À Professora Dr. Lilian Michima a única ex-chefe amiga, obrigado por toda a ajuda nesta árdua caminhada da pesquisa, espero vê-la mais, pois tenho saudades...

À Giovana Krempel Fonseca Meringhe pela ajuda, pela paciência e principalmente pela eficiência e qualidade de seus serviços.

Às minhas Avós, meus Tios e Tias, Primos e Primas que sempre torceram por mim....agradeço a todos da **Família Andrade** e da **Família Furugen**, sem vocês esta conquista não teria sentido.

A Juliana Nascimento Bittar e a seu marido Maurício Bittar, pelo companheirismo e amizade ao longo destes anos de pós-graduação e por confiarem a mim a benção de ser vosso padrinho de casamento.....

A Fabiana Fernandes Bressan (Martini) pela longa e prazerosa amizade, obrigado por existir em nossas vidas...a vida não seria tão boa sem a presença de pessoas como você.

Ao Thiago de Bem ou do bem, pela amizade e companheirismo que crescem a cada dia...

Ao Lucas Sonião (ex-gordo) companheiro, amigo e um dos principais exemplos de vida que eu tenho...continue sempre presente em minha vida...e saiba que ainda vou cobrar o que você me deve....

Aos amigos da Faculdade que sempre me apoiaram em minha escolha profissional e compreendem a minha ausência...**Heidge Jaspion Fukumasu, Johnny B2 Wo, Alex Wilma Fukunari, Wander Chagas Dias, Iara Enema e Orson Meigay Kamasutra....tem o B1 (André)....também ele está tão longe que quase esqueci.....A Leda e o Luis** entram como ex-moradores do Napgama.

Aos moradores, amigos e companheiros da Casa do Napgama, aos que já foram e aos que estão nesta residência....**Cláudio Speto, Sidney Franklin, Marcelo Febem, Francine, Claudia Fernandes Napgirl Raphael, Leda Mococa Marques, Luis Fudêncio Moraes Barros, Fernando Culhão, Flávio Tenébrio Alves, Octávio Askov, Felipe Foca, e mais recentemente...Bruno Botaro em quem...e Cris....**

Ao **Fernando Bom humor Pardo**, uma das grandes amizades conquistadas durante a minha pós-graduação.

A todos os pós -graduandos estrangeiros do Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - **Andres Mejia Escobar Tiquito e Fabian Paraguaio Bao**. Obrigado por mostrarem que o Brasil é realmente o país do futebol...

A todos os pós-graduandos do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) que passaram ou ainda estão presentes em minha vida...**Fabiane Zaffalon, Patrícia, Zé Rodrigo, Gutinho, Gutão, André Granito, André Freire, Marcelo Cardoso, Silas, Filipi Fedozzi, Alexandre Alemão Barreto, Vanessa Marques, Fernando Cogo, Professora Dr. Cláudia Bertan, Prof. Dr. Luis Waldemar, Pesquisador Dr. Alexandre Garcia, Lindsay, Manuel Sá Filho...**

Aos estagiários que por aqui passaram ao longo destes cinco anos...espero que eu lembre o nome de todos...**Gustavo Sacudo, Rodrigo Comichão, Fernanda Bú, Fábio Maculosa, Rafael mintirinha, Patricia Saké, Livia Pangaré, Tieska, Cláudia Columbita, Cindy, Selenia, Marina, Vanessa Mirna, Gabriel, Hélder, Juliana, Ana Paula, Renata, Emily....**

Aos alunos que tive a oportunidade de ajudar e acabei sendo ajudado, pois cada um que passou neste laboratório deixou seus rastros de amizade...**Ticiano (UFMG), Carolina (UFSM), Letícia (UNESP-jaboticabal), Débora (UFMG), Alessandra Brandão (FMVZ-USP) e a Valéria (UFMG) a última que aqui passou, mas não a menos importante.....**

Aos funcionários **Maico Gabriel Alves de Godoy, Valdir da Silva e “Seu Jorge”** tanto pela amizade e carinho que tenho por eles, como pela dedicação e qualidade dos serviços prestados aos animais que tanto gosto.

*Aos funcionários **Márcio de Carli, João Carlos Pinto e José Maria Bernardi**, pela amizade e também pelos auxílios fundamentais para a realização deste trabalho, sem vocês tudo seria mais difícil.*

*Ao secretário do CBRA **Clayton D. Costa** pela disposição, dedicação e presteza em realizar seus serviços, e por vezes ser meu aluno no futebol.*

*As **Donas Edna e Creuza**, uma agora é a responsável e a outra fora por muito tempo por me manter alerta em meu serviço...obrigado pelo café delicioso de cada dia, mas principalmente pela nossa amizade...adoro vocês.*

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

*À **Elza Faquim**, pela agilidade e qualidade e, principalmente por privar seus momentos de lazer em detrimento a ajudar-nos.*

*À **Biotech-Botucatu**, por ceder seus produtos, sem restrições, em todos os momentos que necessitamos.*

Enfim, a todas as pessoas que colaboraram e torceram por mim, meu eterno agradecimento.

RESUMO

ANDRADE, A. F. C. **Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em espermatozóides criopreservados de eqüinos.** [Effects of seminal plasma addition has on capacitation-like changes (Cryocapacitation) in cryopreserved equine spermatozoa]. 2009. 132 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A criopreservação dos espermatozóides eqüinos gera alterações nas membranas semelhantes às que ocorrem durante o processo de capacitação (criocapacitação). Sabe-se que o plasma seminal possui fatores decapacitantes. Além disso, é citado na literatura a possibilidade melhorar a preservação dos espermatozóides com membrana plasmática íntegra e motilidade, após refrigeração ou criopreservação, quando adicionado plasma seminal de animais que apresentam boa resposta à congelação ao sêmen de animais que apresentam espermatozóides com baixa capacidade de congelação. Assim, o presente experimento verificou se a criopreservação gera modificações semelhantes à capacitação e se a adição ao sêmen pós-descongelação de plasma seminal autólogo ou adquirido de um animal com boa resposta à congelação (homólogo) diminuía estes efeitos. Para isso, foram realizadas 5 colheitas de sêmen de 4 garanhões. O sêmen *in natura* foi avaliado e então, processado e submetido à congelação. Após a descongelação o sêmen foi novamente avaliado e então dividido em três tratamentos: adicionado de diluidor de criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % (v/v) de plasma seminal homólogo (PH) ou com 20 % (v/v) de plasma seminal autólogo (PA). Em seguida, o sêmen foi incubado em banho-Maria (37°C) e submetido as avaliações nos três diferentes períodos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação). As avaliações do sêmen consistiram na análise computadorizada das características da motilidade (CASA) e nas análises por citometria de fluxo da reação acrossomal, do potencial de membrana mitocondrial, da estabilidade da membrana plasmática, da peroxidação lipídica e na detecção da fosforilação do aminoácido tirosina presente na superfície da célula espermática. As variáveis foram submetidas à análise de variância e ao teste LSD para comparação das médias, ao nível de 5 % de significância. A criopreservação não aumentou a população de células viáveis com membrana acrossômica reagida, nem a população de células viáveis com aumento na desordem da membrana plasmática (capacitadas). Entretanto, a criopreservação levou a uma redução na quantidade de células com potencial de membrana mitocondrial e aumentou a

peroxidação das membranas, além de induzir o aumento na fosforilação de proteínas presentes na superfície da célula. A criopreservação ocasionou uma redução de todas as variáveis analisadas pelo CASA, incluindo a população identificada como hiperativada. A adição do plasma seminal, indiferentemente da origem, melhorou a integridade da membrana plasmática, reduziu a população com aumento na desordem da membrana plasmática (capacitados), além de reduzir a quantidade de proteínas fosforiladas na superfície do espermatozóide. Porém esta melhora só foi encontrada nas análises iniciais (tempo 0), com o tempo o plasma seminal mostrou não ser um meio adequado para se manter o sêmen armazenado levando a um prejuízo na maioria das variáveis estudadas. Baseado nos resultados, pode-se sugerir a adição de plasma seminal com o intuito de reduzir os efeitos da criocapacitação. Contudo, ao adicionar o plasma seminal ao sêmen, este deve ser depositado no trato reprodutivo da fêmea o mais breve possível.

Palavras-chave: Garanhão. Sêmen congelado. Fosforilação do aminoácido tirosina. Plasma seminal. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

ANDRADE, A. F. C. **Effects of seminal plasma addition has on capacitation-like changes (cryocapacitation) in cryopreserved equine spermatozoa.** [Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em espermatozóides criopreservados de eqüinos]. 2009. 132 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Cryopreservation of equine spermatozoa leads to capacitation-like changes (cryocapacitation). Seminal plasma contains decapacitating factors. Moreover, it has been known that addition of seminal plasma from stallions with good post-thaw semen quality to semen of stallions with low post-thaw semen quality preserve progressive motility and membrane integrity better. Therefore, this study was intended to find out whether the cryopreservation process induces capacitation-like changes and if addition of autologous seminal plasma or seminal plasma from stallion with good post-thaw semen quality (homologous) reduces cryocapacitation effects. For this, five ejaculates were obtained from each of four mature stallions. Samples of *in natura* semen were analyzed, and submitted to cryopreservation. Post-thawed semen was analyzed again so divided in three treatments: only cryopreservation media without cryoprotectants, cryopreservation media without cryoprotectants added 20 % (v/v) of seminal plasma homologous, and cryopreservation media without cryoprotectants added 20 % (v/v) of seminal plasma autologous. All samples were maintained in water bath (37°C) for 120 minutes, while semen analyzes were assessed at time 0, 60 and 120 min. The assessment of each sample was determined by computer-assisted sperm analyses of motility (CASA) and flow cytometry analyzes of acrosome reaction, mitochondrial potential, increased membrane fluidity, lipid peroxidation and degree of protein tyrosine phosphorylation in sperm surface. The variables were submitted to analysis of variance and LSD test at 5% level of significance. Cryopreservation did not increase viable cells with acrosome reaction, neither viable cells with increased membrane fluidity (capacitated). However, cryopreservation led an decrease of cell with mitochondrial potential and an increased in lipid peroxidation, besides increase tyrosine phosphorylation of the equine sperm surface proteins. The cryopreservation caused a reduction of all variables assessed by CASA, including hyperactivated cells. Seminal plasma addition, regardless of origin, improved integrity of plasma membrane, reduced number of viable cells with increased membrane fluidity, besides decrease

phosphorylation of sperm surface proteins. Nevertheless, the improved created only was found in the initial analysis (time 0), seminal plasma shown a harmful effect in maintenance of sperm during incubation. Incubation of sperm in seminal plasma damaged majority of variables assessed. Based on results, seminal plasma could be added to post-thawed semen to decrease the cryocapacitation effects. However, post-thawed semen has to be deposited as soon as possible in female reproductive tract when the seminal plasma is added.

Key words: Stallion. Cryopreserved semen. Tyrosine phosphorylation. Seminal plasma. Flow cytometry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classes lipídicas constituintes do espermatozóide eqüino (Fonte: GADELLA et al., 2001) – Pirassununga - 2009.	41
Tabela 2 - Análise de variância para delineamento com 2 tratamentos, 4 garanhões – Pirassununga - 2009	74
Tabela 3 - Análise de variância para delineamento com 3 tratamentos, 4 garanhões e 3 diferentes tempos de amostragem – Pirassununga - 2009	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema Experimental64

Figura 2 - HTM-IVOS, Versão 12.3, Hamilton Thorn Research, Beverly,
Massachussetts, USA. (Proc. FAPESP-05/60591-6)..... 73

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Gráfico de pontos gerado pela análise de 10.000 células por citometria de fluxo. Amostra corada com a associação H33342, IP, FITC-PSA permitindo a classificação dos espermatozóides eqüinos em quatro categorias – Pirassununga - 2009.....66
- Gráfico 2 - Gráfico de pontos gerado pela análise de 10.000 células por citometria de fluxo. Amostra corada com a sonda JC-1 permitindo a classificação dos espermatozóides eqüinos em três categorias – Pirassununga - 2009.....67
- Gráfico 3 - Gráfico de pontos (A) gerado pela análise por citometria de fluxo em amostra corada com a associação das sondas fluorescentes C11-BODIPY, H33342 e IP. No gráfico de pontos podem-se observar duas categorias distintas, sendo que o quadrante MPI contém os espermatozóides eqüinos com a membrana plasmática íntegra e selecionados para a avaliação da intensidade da peroxidação das membranas. O histograma (B) apresenta a população selecionada MPI que está sendo analisada quanto à distribuição da fluorescência captada no fotomultiplicador com *band pass* de 530 ± 15 nm (células com peroxidação lipídica). O valor obtido é indicado no quadro como a média e a mediana em unidades arbitrárias (ua) – Pirassununga - 2009.....69
- Gráfico 4 - Gráfico de pontos gerado pela análise por citometria de fluxo, neste caso as células foram coradas com a associação do H33342, Yo-Pro-1 e da Merocianina 540 permitindo a classificação dos espermatozóides eqüinos em três categorias – Pirassununga - 2009.....71
- Gráfico 5 - Gráfico de pontos (A) gerado pela análise por citometria de fluxo em amostra corada com a associação de H33342, com anticorpo antifosfotirosina conjugado ao FITC e a sonda fluorescente IP. No gráfico de pontos podem-se observar duas categorias distintas, sendo a MPI os espermatozóides eqüinos com a membrana plasmática íntegra e selecionados para a avaliação da detecção dos resíduos de tirosina presentes na superfície da célula. O histograma (B) apresenta a população selecionada MPI que está sendo analisada quanto à distribuição da fluorescência captada no fotomultiplicador com *band pass* de 530 ± 15 nm (células marcadas com o anticorpo antifosfotirosina). O valor obtido é indicado no quadro como a média e a mediana em unidades arbitrárias (ua) – Pirassununga - 2009.....72

Gráfico 6- Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) com membrana acrossomal íntegra e membrana plasmática íntegra (AIMI), células com acrossoma reagido e membrana plasmática íntegra (ARMI), células com membrana acrossomal íntegra (MAI) e células com membrana plasmática íntegra (MPI) no sêmen eqüino <i>in natura</i> e pós-descongelção – Pirassununga - 2009.....	78
Gráfico 7 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) com potencial de membrana mitocondrial (CP) no sêmen eqüino <i>in natura</i> e pós-descongelção – Pirassununga - 2009.....	79
Gráfico 8 - Médias $\pm$ erros padrão dos valores lineares médios da intensidade da fluorescência da população espermática com membrana plasmática íntegra e coradas com a sonda fluorescente C11-BODIPY ^{581/591} (IFPERMI) no sêmen eqüino <i>in natura</i> e pós-descongelção. Os valores estão representados em unidades arbitrárias (ua) – Pirassununga - 2009.....	80
Gráfico 9 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) viáveis não capacitadas (NCAP) e células viáveis capacitadas (CAP) no sêmen eqüino <i>in natura</i> e pós-descongelção – Pirassununga - 2009	81
Gráfico 10 - Médias $\pm$ erros padrão dos valores lineares médios da intensidade da fluorescência emitida pela população espermática com membrana plasmática íntegra e marcada com o anticorpo antifosfotirosina conjugado a uma fluoresceína (IFMPIANT) no sêmen eqüino <i>in natura</i> e pós-descongelção. Os valores estão representados em unidades arbitrárias (ua) – Pirassununga - 2009.....	82
Gráfico 11 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) hiperativadas (HIPER) no sêmen eqüino <i>in natura</i> e pós-descongelção – Pirassununga - 2009.....	83
Gráfico 12 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) classificadas com motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e como células rápidas (RAP) no sêmen eqüino <i>in natura</i> e pós-descongelção – Pirassununga - 2009.....	84
Gráfico 13 - Médias $\pm$ erros padrão das velocidades (μ m/s) de trajeto (VAP), progressiva (VSL) e curvilínea (VCL) no sêmen eqüino <i>in natura</i> e pós-descongelção – Pirassununga - 2009.....	84
Gráfico 14 - Médias $\pm$ erros padrão da frequência de batimentos (BCF, Hz) no sêmen eqüino <i>in natura</i> e pós-descongelção – Pirassununga - 2009.....	85

Gráfico 15 - Médias $\pm$ erros padrão da amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozóide (ALH, μ m) no sêmen eqüino <i>in natura</i> e pós-descongelção – Pirassununga - 2009.	85
Gráfico 16 - Médias $\pm$ erros padrão da retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %) no sêmen eqüino <i>in natura</i> e pós-descongelção – Pirassununga - 2009.	86
Gráfico 17 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) com membranas acrossomal e plasmática íntegras (AIMI) no sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009.....	87
Gráfico 18 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) com membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida (ARMI) no sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009.....	88
Gráfico 19 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células com membrana acrossomal íntegra (MAI) no sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009.....	89
Gráfico 20 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade (%) de células com membrana plasmática íntegra (MI) no sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009.....	90
Gráfico 21 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) com potencial de membrana mitocondrial (CP) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) e com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009.	91

- Gráfico 22 - Médias $\pm$ erros padrão dos valores lineares médios da intensidade de fluorescência emitida pelas células viáveis (IFPERMI; u.a.) do sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009..... 92
- Gráfico 23 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) não capacitadas (NCAP) no sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009..... 93
- Gráfico 24 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) capacitadas (CAP) no sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009..... 94
- Gráfico 25 - Médias $\pm$ erros padrão dos valores lineares médios da intensidade de fluorescência emitida pelas células viáveis (IFPIANT; u.a.) do sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009..... 95
- Gráfico 26 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) hiperativadas após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) e com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009..... 96
- Gráfico 27 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células com motilidade total (MT, %) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009..... 97
- Gráfico 28 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células com motilidade progressiva MP, %) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal

autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009.....	98
Gráfico 29 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (CR, %) rápidas após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009.....	99
Gráfico 30 - Médias $\pm$ erros padrão da variável velocidade de trajeto (VAP, μ m/s) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009.....	100
Gráfico 31 - Médias $\pm$ erros padrão da velocidade progressiva (VSL, μ m/s) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009.....	101
Gráfico 32 - Médias $\pm$ erros padrão da velocidade curvilínea (VCL, μ m/s) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009.....	102
Gráfico 33 - Médias $\pm$ erros padrão da frequência de batimentos (BCF, Hz) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009.....	103
Gráfico 34 - Médias $\pm$ erros padrão da amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μ m) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009.....	104

Gráfico 35 - Médias $\pm$ erros padrão da retilinearidade (STR, %) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009..... 105

Gráfico 36 - Médias $\pm$ erros padrão da linearidade (LIN, %) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009..... 106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar
AIMI	espermatozóides viáveis com a membrana acrossomal íntegra
ALH	amplitude lateral da cabeça
AP	espermatozóide com alto potencial de membrana mitocondrial
ARMI	espermatozóides viáveis com membrana acrossomal reagida
B	capacitado com o acrossoma intacto
BCF	frequência de batimento
BP	espermatozóide com baixo potencial de membrana mitocondrial
C11-BODIPY ^{581/591}	4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3 ^a ,4 ^a -diazas-indacene-3-undecanoic acid
Ca^{2+}	íon cálcio
cAMP	adenosina-monofosfato cíclica
CAP	células viáveis capacitadas
CAPAC	espermatozóide capacitado com membrana plasmática íntegra
CASA	<i>Computer Assisted Semen Analysis</i> (Análise Computadorizada do Sêmen)
Cl^-	íon cloro
CP	somatória das células com potencial de membrana mitocondrial
CRISP	proteínas secretórias ricas em cisteína
CTC	clortetraciclina
DIL	sêmen pós-descongelamento adicionado de congelamento sem crioprotetor
DNA	ácido desoxirribonucléico
EROs	espécies reativas de oxigênio
F	não apacitado
FITC	isotiocianato de fluoresceína
Fn-2	fibronectina tipo II
g	grama

<i>g</i>	gravidade
GLM	General Linear Models
GPX	glutathione peroxidase
GRD	glutathione reductase
GSH	glutathione
H258	Hoechst 33258
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
H33342	Hoechst 33342
H-89	inibidor seletivo da proteína quinase A
HDL	lipoproteína de alta densidade
HIPER	células hiperativadas
HO ₂	hidroperóxido
HOCL	ácido hipocloroso
HOCl	ácido hipocloroso
Hz	Hertz
IA	inseminação artificial
IFMPIANT	intensidade da fluorescência emitida pela população espermática com membrana plasmática íntegra e marcada com o anticorpo antifosfotirosina conjugado a uma fluoresceína
IFPERMI	intensidade da fluorescência da população espermática com membrana plasmática íntegra e coradas com a sonda fluorescente C11-BODIPY ^{581/591}
IP	iodeto de propídio
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
K ⁺	íon potássio
kDa	quilodalton
LIN	linearidade
MAI	somatéria das células com membrana acrossomal íntegra
mg	miligrama
Mg ²⁺	íon magnésio
MI	somatéria das células com membrana plasmática íntegra
min	minuto

mL	mililitro
mM	milimolar
MP	espermatozóide com médio potencial de membrana mitocondrial
MP	motilidade progressiva
MPI	células com membrana plasmática íntegra (viáveis)
MPL	espermatozóide com membrana plasmática lesada
MT	motilidade total
Na ⁺	íon sódio
NCAP	células viáveis não capacitadas
NCMPI	espermatozóide não capacitado com membrana plasmática íntegra
nm	nanômetro
O ₂ ^{-•}	ânion superóxido
OH ⁻	radicais hidroxil
p	nível de significância
PA	sêmen pós-descongelamento adicionado de plasma seminal autólogo
pH	concentração de íons de hidrogênio
PH	sêmen pós-descongelamento adicionado de plasma seminal homólogo
PKA	proteína quinase A
PSA	aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
RO [•]	alcoxil
ROO ⁻	peroxil
s	segundos
SAS	Statistical Analysis System (Sistema de Análise Estatística)
SNAREs	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins</i>
SOD	superoxido-dismutase
STR	retilinearidade
TALP	meio de Tyrode suplementado com albumina, lactato e piruvato
TALPm	meio de Tyrode suplementado com lactato e piruvato e sem adição de CaCl 2H ₂ O e NaHCO ₃
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
ua	unidades arbitrárias
VAP	velocidade do trajeto

VCL	velocidade curvilinear
VSL	velocidade progressiva

LISTA DE SÍMBOLOS

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	34
2 REVISÃO DE LITERATURA	39
2.1 O ESPERMATOZÓIDE E A MEMBRANA PLASMÁTICA.....	39
2.1.1 COMPOSIÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA	40
2.1.2 FUNÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA	42
2.2 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA	43
2.3 FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	45
2.4 HIPERMOTILIDADE	47
2.5 REAÇÃO ACROSSÔMICA	48
2.6 MUDANÇAS SEMELHANTES À CAPACITAÇÃO (CRIOCAPACITAÇÃO)	49
2.7 PLASMA SEMINAL	50
2.8 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA CAPACITAÇÃO E NA CRIOCAPACITAÇÃO	53
3 HIPÓTESES	56
4 OBJETIVOS	58
5 MATERIAL E MÉTODO.....	60
5.1 LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL.....	60
5.2 ANIMAIS	60
5.3 COLHEITA E AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA	61
5.4 CONGELAÇÃO DO SÊMEN	61
5.5 OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DO PLASMA SEMINAL.....	62
5.6 DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN E DISTRIBUIÇÃO NOS TRATAMENTOS.....	62
5.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO	66
5.9 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO DAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	67
5.10 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE (FLUIDEZ) DA MEMBRANA PLASMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO	69
5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
6 RESULTADOS	77
6.1 EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE AS CÉLULAS ESPERMÁTICAS	77
6.1.1 EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NA REAÇÃO ACROSSÔMICA.....	77
6.1.2 EFEITO DE CRIOPRESERVAÇÃO NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	78

6.1.3 CONSEQUÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A PEROXIDAÇÃO DAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS.....	79
6.1.4 CONSEQUÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO NA ESTABILIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA	80
6.1.5 EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NA FOSFORILAÇÃO DOS RESÍDUOS DE TIROSINA PRESENTES NA SUPERFÍCIE DO ESPERMATOZÓIDE.....	81
6.1.6 EFEITO DA CONGELAÇÃO SOBRE A HIPERATIVAÇÃO ESPERMÁTICA	82
6.1.7 EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO	83
6.2 EFEITO DA ADIÇÃO DO PLASMA SEMINAL SOBRE AS MUDANÇAS SEMELHANTES À CAPACITAÇÃO E A PEROXIDAÇÃO DAS MEMBRANAS EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	86
6.2.1 EFEITO DA ADIÇÃO DO PLASMA SEMINAL SOBRE A REAÇÃO ACROSSOMAL E A INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO COM OS TRATAMENTOS	87
6.2.2 EFEITO DA ADIÇÃO DOS TRATAMENTOS NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	90
6.2.3 CONSEQUÊNCIA DA ADIÇÃO DOS TRATAMENTOS EM FUNÇÃO DO TEMPO SOBRE A PEROXIDAÇÃO DAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS.....	91
6.2.4 EFEITO DA ADIÇÃO DO PLASMA SEMINAL EM FUNÇÃO DO TEMPO NA MANUTENÇÃO DA ESTABILIDADE (FLUIDEZ) DA MEMBRANA PLASMÁTICA.....	92
6.2.5 EFEITO DA ADIÇÃO DO PLASMA SEMINAL EM FUNÇÃO DO TEMPO SOBRE A FOSFORILAÇÃO DOS RESÍDUOS DE TIROSINA PRESENTES NA SUPERFÍCIE DO ESPERMATOZÓIDE	94
6.2.6 EFEITO DA ADIÇÃO DOS TRATAMENTOS EM FUNÇÃO DO TEMPO SOBRE A POPULAÇÃO DE CÉLULAS HIPERATIVADAS	95
6.2.7 EFEITO DA ADIÇÃO DOS TRATAMENTOS EM FUNÇÃO DO TEMPO NAS CARACTERÍSTICAS DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO	96
7 DISCUSSÃO	108
8 CONCLUSÕES	115
REFERÊNCIAS	117
ANEXOS	130

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Embora a primeira gestação em éguas utilizando espermatozóides criopreservados de garanhão tenha sido relatada por Barker e Gandier¹ (PAPA et al., 2008, p. 296), a eficiência e a difusão da técnica tiveram pouco progresso. Muito disto deveu-se às baixas taxas de prenhez obtidas com a utilização desta técnica na espécie eqüina quando se comparam com os resultados por monta natural e inseminação com sêmen fresco e refrigerado (COTTORELLO; HENRY, 2002).

A fertilidade reduzida associada à inseminação com sêmen congelado vem sendo atribuída ao processo de congelação do sêmen que produz danos aos espermatozóides. Tais danos podem ser ultra-estruturais, físicos, bioquímicos e funcionais, e que levam as membranas espermáticas a apresentarem uma quebra da assimetria bilipídica (WATSON, 1995). Pode-se ainda incluir a estes danos: a perda de motilidade, alterações na cromatina e na morfologia do espermatozóide, permeabilização significativa conjuntamente com a desestabilização das membranas e geração de espécies reativas de oxigênio (HOLT; NORTH, 1986; WINDSOR; WHITE, 1995; BOQUET et al., 1999; BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000; WATSON, 2000; CELEGHINI et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2008).

As alterações nas membranas das células podem ser associadas às mudanças de temperatura durante o processo de refrigeração, pelos efeitos deletérios dos componentes do meio e finalmente pelos efeitos da descongelação (WATSON, 1995).

As modificações geradas nas membranas espermáticas, durante as etapas da congelação do sêmen, assemelham-se às ocorridas nas células capacitadas, o que levou alguns autores a levantarem a hipótese que a criopreservação promove a capacitação do espermatozóide (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000; WATSON, 2000). Esta "criocapacitação" é freqüentemente citada como um dos fatores associados à redução da longevidade do espermatozóide criopreservado no trato reprodutivo da fêmea (WATSON, 1995; POMMER; MEYERS, 2002; SCHEMBRI et al., 2002; VADNAIS et al., 2005; VADNAIS; ROBERTS, 2007).

¹ BARKER, C.A., GANDIER, S.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Can. J. Comp. Med.** v. 21, p. 47-51, 1957.

A capacitação espermática é um evento crítico já que este é obrigatório para que ocorra a reação acrossomal e a fertilização (POMMER; MEYER, 2002). Entretanto a diferenciação entre uma célula capacitada e uma não capacitada permanece como uma ciência não exata, apesar dos quase 60 anos desde Chang (1951) e Austin (1952) terem descrito este fenômeno.

Os mecanismos da capacitação não se encontram totalmente elucidados, sabe-se, porém, que envolve complexos eventos moleculares e bioquímicos como o efluxo de colesterol da membrana plasmática, o influxo de cálcio para o interior da célula, aumento da concentração de bicarbonato intracelular, aumento da fluidez da membrana plasmática, mudanças no padrão da motilidade (hiperativação), reação acrossomal e ativação da via da adenosina-monofosfato cíclica (cAMP) que resulta na fosforilação do aminoácido tirosina (CROSS, 1993; VISCONTI; KOPF, 1998; URNER; SAKKAS, 2003). Sabendo-se dos mecanismos que atuam na capacitação, foram desenvolvidas técnicas que permitem o acompanhamento deste evento que compõe a maturação extra-testicular da célula espermática.

A coloração com a clortetraciclina (CTC) vem sendo utilizada como método para a avaliação da capacitação de espermatozoides em diversas espécies, tais como eqüinos (SCHEMBRI et al., 2002; NEILD, et al., 2003), bovinos (CORMIER; BAILEY, 2003), suínos (VADNAIS et al., 2005) e humanos (VILLEGAS et al., 2003). Esta técnica permite distinguir três estágios do processo de capacitação; não capacitado (F), capacitado com o acrossoma intacto (B) e capacitado com o acrossoma reagido (AR). Entretanto, esta técnica carece de uma maior compreensão, no caráter de seu mecanismo de ação, de como a CTC interage com a superfície do espermatozoide (VISCONTI et al., 1998; FLESCH et al., 1999; GREEN; WATSON, 2001), além de poder apenas ser realizada em células fixadas (RATHI et al., 2001). Acredita-se que as mudanças na distribuição do complexo Ca^{2+} -CTC ligados aos fosfolípidios da membrana plasmática sejam responsáveis pelos diferentes padrões observados (VISCONTI et al., 1998; GREEN; WATSON, 2001).

A Merocianina 540 é uma sonda hidrofóbica que cora mais intensamente as membranas que possuem um maior estado de desordem de seus componentes (translocação dos fosfolípidios na bicamada lipídica), como é o caso do espermatozoide capacitado. Uma das grandes vantagens da Merocianina 540 é que esta pode ser combinada a um corante impermeável a membrana plasmática e que se ligue ao DNA da

célula (Yo-Pro-1), permitindo uma análise da viabilidade da célula em conjunto ao estado de sua membrana lipídica. Esta associação de corantes é passível de ser analisada pela técnica de citometria de fluxo (HARRISON; ASHWORTH; MILLER, 1996; RATHI et al., 2001; THOMAS; MEYERS; BALL, 2006).

A avaliação da reação acrossômica dos espermatozóides viáveis também pode ser realizada pela técnica de citometria de fluxo só que utilizando outra associação de sondas fluorescentes, tal como, a aglutinina de *Psium Sativum* (PSA) conjugada a um fluoróforo (ex. o isotiocionato de fluoresceína - FITC), junto ao Iodeto de Propídeo (IP) (CHOI et al., 2003; ANDRADE et al., 2006; ARRUDA et al., 2008).

Asquith et al. (2004) demonstraram que ocorre a fosforilação da tirosina de proteínas presentes na superfície (principalmente na região da cabeça) dos espermatozóides capacitados de camundongos e que estas proteínas estão envolvidas no processo de reconhecimento entre o gameta masculino e feminino. A presença do aminoácido tirosina fosforilado nas células viáveis (célula com membrana plasmática íntegra) pode ser identificada com o uso de anticorpos específicos conjugados a um fluoróforo (ex. Fluoresceína, FITC), deste modo, permitindo sua detecção por análise em citometria de fluxo, seja na espécie suína (PIEHLER et al., 2006) ou na equina (ANDRADE et al., 2008).

O movimento característico apresentado pela célula espermática durante o fenômeno da hiperativação é detectado pelas análises computadorizadas da motilidade (CASA – *Computer Assisted Sperm Analysis*). Este padrão de movimento é representado pelo aumento do ALH (amplitude do deslocamento lateral da cabeça) e do VCL (velocidade curvilínea) (WHITE; AITKEN, 1989; BURKMAN, 1991).

A adição do plasma seminal ao sêmen pós-descongelamento tem a capacidade de reduzir a criocapacitação já que reduz o número de espermatozóides capacitados e/ou com acrossomo reagido em humanos e carneiros (HAN et al., 1990; CROSS, 1993; GUTHRIE; MAXWELL; JOHNSON, 2000) e melhora a viabilidade e a motilidade dos espermatozóides (GUTHRIE; MAXWELL; JOHNSON, 2000). Fato este, que leva a obtenção de melhores resultados nos índices de prenhez em inseminações com sêmen criopreservado de carneiros (MAXWELL et al., 1999), ou seja, a criocapacitação e os efeitos deletérios da refrigeração podem ser revertidos com a adição de plasma seminal autólogo ao sêmen descongelado ou submetido a refrigeração (CROSS, 1993; BARRIOS et al., 2000; GUTHRIE; MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Na espécie eqüina, antes de se submeter o sêmen à congelação realiza-se a centrifugação. Este procedimento é necessário para a retirada da maior parte do plasma seminal, pois este contém altas concentrações de cloreto de sódio, prejudicial aos espermatozóides durante a criopreservação (NISHIKAWA, 1975), e para promover o aumento da concentração dos espermatozóides, o qual é essencial para permitir o envasamento (NEVES NETO, 2004). Este plasma seminal retirado é então descartado, mesmo este sendo proveniente de um garanhão com sêmen de boa capacidade de congelação. Apesar de se ter o conhecimento que na espécie eqüina a adição de plasma seminal de garanhões com boa qualidade seminal pós-descongelação ao sêmen de garanhões com baixa qualidade seminal pós-descongelação leva estes a um aumento da motilidade progressiva e da integridade da membrana plasmática (AURICH et al., 1996).

Diante do exposto, a definição para se considerar uma célula capacitada, bem como criocapitada, deve se basear em uma análise dos múltiplos processos que ocorrem durante este evento de maturação extra-testicular. Esta análise multifatorial da célula pós-criopreservação poderá nos elucidar se existe uma real capacitação prematura do espermatozóide eqüino durante a criopreservação e se este processo pode ser prevenido ou atrasado com a adição de plasma seminal, seja do próprio animal (autólogo) ou de um outro garanhão (homólogo) com sêmen com boa resposta a congelação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Alguns tópicos importantes serão revisados a seguir, para um melhor entendimento das possíveis alterações que podem ocorrer com a célula espermática durante a criopreservação do sêmen e os motivos pelos quais se acredita que durante este processo há mudanças que se assemelham as que ocorrem durante a capacitação. Além de elucidar as razões que levam a crer que a adição do plasma seminal tem a capacidade de reverter e/ou inibir este processo que acaba levando a uma diminuição na sobrevivência do espermatozóide no trato reprodutivo da fêmea equina.

2.1 O ESPERMATOZÓIDE E A MEMBRANA PLASMÁTICA

Os espermatozóides quando completamente desenvolvidos, são células alongadas, consistindo de uma cabeça achatada contendo o núcleo e uma cauda responsável pela motilidade celular. Esta célula possui uma morfologia altamente diferenciada, a qual é refletida por sua superfície. A cabeça do espermatozóide, a peça intermediária e a cauda são divididas pelo anel posterior e a estrutura do *annulus*, respectivamente (GADELLA et al., 2008a). Estas estruturas supostamente funcionam como uma espécie de barreira juncional para as trocas lipídicas entre a cabeça e a peça intermediária e desta com a cauda. A superfície da cabeça do espermatozóide possui no mínimo quatro regiões identificadas: a área apical, a área pré-equatorial, a equatorial e a pós-equatorial. Lembrando que a cabeça do espermatozóide não contém barreiras juncionais para manter estas regiões (DE LEEUW et al., 1990) e que poderiam explicar esta separação em áreas que contém determinadas proteínas e lipídeos (GADELLA et al., 2008b).

Desta maneira deve-se considerar que o espermatozóide é uma célula altamente especializada que armazena e transporta o material genético. Esta tem a capacidade de se mover ativamente e de fertilizar o oócito. Durante a espermatogênese,

subseqüentemente a maturação no epidídimo e finalmente ao ser depositado no trato genital feminino, o espermatozóide obtém estas habilidades que são altamente dependentes da membrana plasmática (AURICH, 2005).

2.1.1 COMPOSIÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA

O modelo do mosaico fluido (SINGER; NICOLSON, 1972) foi proposto como um vaticínio de como as membranas celulares são construídas. Neste modelo a membrana é organizada como uma bicamada de fosfolipídios anfipáticos, na qual as partes hidrofóbicas (cauda) permanecem no interior e as hidrofílicas fiquem, ou extracelular ou em contato com o citoplasma (GADELLA et al., 2008a).

As células espermáticas eqüinas (assim como outros mamíferos) têm uma composição e organização lipídica distinta de sua membrana plasmática. O espermatozóide do garanhão contém aproximadamente 57 % de fosfolipídios, 37 % de colesterol e 6 % de glicolipídeos (Tabela 1). Muitos dos componentes não sofrem mudanças durante a capacitação, com exceção do colesterol, o qual sofre depleção da membrana plasmática durante este processo (GADELLA et al., 2001).

Tabela 1 - Classes lipídicas constituintes do espermatozóide equino– Pirassununga - 2009

Colesterol	37,4 % ²
Fosfatidilcolina (FC)	23,2 % ¹
Fosfatidiletanolamina (PE)	8,0 % ¹
Fosfatidilserina (PE)	7,5 % ¹
Esfingomielina (SPH)	6,4 % ¹
Seminolipideo (SGG)	6,2 % ¹
Fosfatidilglicerol (PG)	2,5 % ¹
Fosfatidilinositol (PI)	1,5 % ¹
Desconhecidos	7,3 % ¹

(Fonte: GADELLA et al., 2001)

Capacitação na presença de albumina resulta em:

¹Nenhuma redução absoluta da quantidade de fosfolipídeos e seminolipídeos

²Mais de 45 % de depleção do colesterol

A membrana é sobrecarregada de fosfolipídios poliinsaturados, sendo que basicamente estes fosfolipídios podem compensar a perda de colesterol, já que os fosfolipídios poliinsaturados são mais flexíveis que os saturados e podem, desta forma, manter a dinâmica da bicamada lipídica. A membrana plasmática tem uma distribuição assimétrica por toda bicamada lipídica. Mais especificamente, a fosfatidilcolina e a esfingomielina encontram-se preferencialmente no folheto externo da membrana (tem contato com os fluidos extracelulares), enquanto que a fosfatidiletanolamina e especialmente a fosfatidilserina estão localizadas no folheto interno da membrana (tem contato com o citosol da célula) (GADELLA et al., 1999; GADELLA et al., 2008).

2.1.2 FUNÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA

Durante sua passagem do testículo para o sítio de fertilização na tuba uterina, o espermatozóide encontra uma grande variedade de fluidos que variam desde sua origem até sua composição (ex. compare o fluido testicular com o plasma seminal e estes com as secreções da tuba uterina). Estes fluidos são de grande importância nos processos de desenvolvimento pós-testicular, como a maturação e a capacitação, estes transformam o espermatozóide, que até o momento é uma célula imóvel e infértil, em uma célula vigorosamente ativa e com a capacidade de se ligar, e por fim, se fundir ao oócito. O desenvolvimento pelo qual o espermatozóide passa durante o período pós-testicular deve ocorrer de maneira que seja respeitada uma hierarquia nas sinalizações, de maneira que iniciada por diferentes agonistas presentes nos diferentes fluidos, o espermatozóide chegue ao local de fertilização apto a fundir-se com o oócito. Com este cenário em mente, percebe-se que não basta apenas o espermatozóide completar todos os seus estágios de desenvolvimento em uma sequência correta, mas que ele não responda as sinalizações externas prematuramente (JONES et al., 2007).

Neste contexto, a organização da membrana plasmática torna-se de suma importância. O espermatozóide é uma célula altamente diferenciada, este tem a superfície de sua membrana dividida em compartimentos que são caracterizados pela presença restrita de certos lipídios e proteínas (ANDERSON; JACOBSON, 2002; VEREB et al., 2003; JONES et al., 2007). Com o conhecimento adquirido de trabalhos em outros tipos celulares, sabe-se que a ligação de um agonista com a respectiva ativação de um receptor, frequentemente envolve um complexo grupo multi-molecular, o qual carrega o sinal externo através da membrana plasmática para o interior do citoplasma onde o sinal é amplificado e produz a resposta (BROMLEY et al., 2001). Já que o espermatozóide não sintetiza novas proteínas de membrana, a geração dos sinais requer que moléculas separadas espacialmente, provavelmente de diferentes regiões da célula, trabalhem em conjunto. Estes complexos, por sua vez, realizam migrações polarizadas de regiões onde estas são inativas para áreas em que se tornam completamente funcionais. Estes acontecimentos seguindo o seguinte conceito: “vindo de um apropriado lugar, em um apropriado momento e de uma forma correta” (HOWES et al., 2001). Estes complexos ou em sua forma individual estão sujeitas a forças de difusão que em muitas situações são

geradas por migrações polarizadas controladas por mecanismos ainda desconhecidos, mas que podem envolver o citoesqueleto (JONES, et al., 1990).

O espermatozóide maduro não possui a maioria das organelas comuns a outros tipos celulares, somando-se a isso sua transcrição de DNA é suspensa, ou seja, a síntese de novos componentes para a membrana plasmática se tornam impossíveis (EDDY; O'BRIEN, 1994). Assim danos na membrana plasmática resultam em perdas irreversíveis da motilidade e/ou da capacidade fertilizante (MORRIS; HUNTER; ALLEN, 2000).

2.2 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

A capacitação do espermatozóide de mamíferos foi primeiramente descrita a mais de 50 anos como um evento essencial a fertilização. Dois fisiologistas trabalhando independentemente em diferentes espécies e continentes concluíram sobre o tempo necessário para que o espermatozóide alcançasse o local de fertilização, e da necessidade de um período de maturação final no trato reprodutivo feminino antes do espermatozóide se tornar capaz de penetrar nos revestimentos do oócito. Austin trabalhou com ratos em Sidnei, Austrália e Chang em Massachusetts, EUA, usando coelhos. Eles descobriram que a maturação final de célula levava por volta de 2-6 horas, sendo que este fenômeno foi prontamente identificado em outras espécies. Porém, passados todos estes anos, este processo fundamental ainda não se encontra completamente elucidado (HUNTER, 2001).

A capacitação é um evento seqüencial que envolve numerosas mudanças fisiológicas como as alterações na fluidez das membranas, o aumento da concentração de íons intracelulares e o aumento das sinalizações intracelulares. Durante este processo ocorrem diversos eventos bioquímicos, sendo que alguns já foram identificados, nos quais se incluem: remoção dos fatores periféricos das membranas, mudanças na composição lipídica, produção de espécies reativas de oxigênio, migração das proteínas de membrana, exteriorização de receptores, ativação dos canais iônicos, produção intracelular de cAMP e a fosforilação do aminoácido tirosina (WHITE; AITKEN, 1989; FRASER; MONKS, 1990; ZANEVELD et al., 1991; DUNKAN; FRASER, 1993; AITKEN et al.,

1995; BURKES et al., 1995; VISCONTI et al., 1995; EMILIOZZI; FENICHEL, 1997; VISCONTI; KOPF, 1998).

A capacitação pode ser mimetizada *in vitro* em um meio definido cuja composição é baseada na concentração de eletrólitos que compõem o fluido folicular. Tipicamente, o meio contém uma fonte de energia (ex. piruvato, lactato e glicose), um sequestrador de colesterol (geralmente a albumina sérica), bicarbonato, Ca^{2+} , baixa concentração de K^{+} e concentração fisiológica de Na^{+} , sendo que alguns destes desempenham um importante papel no processo de capacitação (GRASA; CEBRIÁN-PÉREZ; MUIÑO-BLANCO, 2006). Porém, o mecanismo de ação destes compostos é pouco compreendido do ponto de vista molecular; entretanto muitos eventos moleculares que envolvem o início da capacitação já foram identificados sendo estes; a remoção do colesterol da membrana, o influxo de íons e o aumento da fosforilação do aminoácido tirosina.

A albumina sérica, um componente essencial do meio de capacitação *in vitro*, funciona como um carreador do colesterol, se ligando a este e removendo-o da membrana plasmática (CROSS, 1998; NAZ; RAJESH, 2004). Sabe-se que a capacitação pode ser inibida pela adição de colesterol e/ou análogos de colesterol ao meio de capacitação (VISCONTI et al., 1999). Além disso, a albumina sérica pode ser substituída *in vitro* pela lipoproteína de alta densidade (HDL) (THERIEN; SOUBEYRAND; MANJUNATH, 1997) e até por álcool polivinílico como demonstrado por Choi et al. (2003). A retirada do colesterol da membrana plasmática é um processo que antecede múltiplos sinais intrínsecos ao processo de capacitação (VISCONTI et al., 2002).

A retirada do colesterol da membrana plasmática do espermatozóide ainda não é totalmente compreendida. Porém sabe-se que a retirada do colesterol é seguida pela quebra de certos conjuntos de lipídios que ativam os eventos que envolvem a atuação do cAMP, das tirosina kinases, proteína G, e/ou outras moléculas (VISCONTI et al., 1999). Esta retirada do colesterol só ocorre quando o espermatozóide é incubado em um meio com bicarbonato, sendo esta retirada específica já que não afeta o conteúdo dos outros fosfolipídios da membrana (GADELLA et al., 2001). Deste modo pode-se considerar que o efluxo de colesterol induz o aumento da fluidez e da permeabilidade das membranas espermáticas, o que eventualmente conduz a fusão entre as membranas culminando na reação acrossomal (LANDIM-ALVARENGA et al., 2001).

O bicarbonato é um potente agente capacitor sendo quase ausente no plasma seminal (<1 mM), porém presente na tuba uterina em altas concentrações (>15 mM). O

bicarbonato induz a ativação da via do cAMP que atua na ativação da proteína quinase A, a qual atua aumentando a fluidez da membrana plasmática (HARRISON et al., 1996). O bicarbonato induz as trocas entre os lipídios presentes nas monocamadas fosfolipídicas que compõem a bicamada lipídica dos espermatozóides eqüinos (GADELLA; HARRISON, 2000; GADELLA et al., 2001; RATHI et al., 2001). Estas trocas entre os fosfolipídios ocorrem somente na região apical da membrana plasmática do espermatozóide, sendo que este fenômeno é pré-requisito para que ocorra o efluxo do colesterol (FLESCH et al., 2001). Em garanhões, sabe-se que o plasma seminal bloqueia o efluxo de colesterol da membrana plasmática por meio das vesículas ricas em colesterol de origem prostática. (prostassomos; MINELLI et al., 1998).

O envolvimento do Ca^{2+} , no início e/ou regulação da capacitação é controverso até o momento, apesar do uso deste como promotor da reação acrossomal. No espermatozóide de camundongos é evidente a necessidade da presença de Ca^{2+} no meio extracelular para que haja a capacitação, sendo que este atua na via da adenilato ciclase (VISCONTI et al., 1995), embora estes estudos não tenham mensurado o Ca^{2+} intracelular.

Uma distinção deve ser feita entre a capacitação e a subsequente reação acrossomal, já que nas células viáveis *in vivo*, a conclusão da anterior precede o início da última (HUNTER, 2001).

2.3 FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Os espermatozóides maduros possuem sua particular idiossincrasia como células altamente especializadas. Estas são altamente compartimentalizadas, inativas quanto à transcrição gênica e inaptas a sintetizar novas proteínas. Desta maneira, percebe-se a grande importância das fosforilações das proteínas como forma de alterar suas funções, quando comparado a outros tipos celulares. Durante a fertilização, a função espermática é regulada por um sistema de sinais intracelulares que controlam fosforilações de proteínas. A fosforilação dos aminoácidos Serina/Treonina e da Tirosina ocorrem no espermatozóide, mas somente algumas proteínas fosforiladas foram identificadas. Embora a via do cAMP-dependente da proteína quinase A desempenhe um papel central

na função espermática e já tenha sido estudada em detalhes (VISCONTI; KOPFE, 1998), o conhecimento sobre as tirosina quinases e outras serina/treonina quinases permanece limitado (URNER; SAKKAS, 2003).

Embora ocorra a fosforilação nos aminoácidos serina, treonina e na tirosina, a fosforilação do aminoácido tirosina é muito importante e deve ser considerada como a primeira, ou até mesmo a única a ser interpretada como um sinal de transdução em uma célula (NAZ; RAJESH, 2004).

Os processos regulados pela fosforilação do aminoácido tirosina incluem a capacitação, hiperativação e a reação acrossomal, todas essas funções necessárias para que o espermatozóide alcance e se fusione ao ócito (VISCONTI et al., 2002).

Em geral, a fosforilação do aminoácido tirosina é estudada pela identificação de proteínas com tirosina fosforilada, em populações espermáticas durante a capacitação e após a exposição a indutores da reação acrossômica, pela técnica de Western blot. Estes estudos levaram ao acúmulo de informações quanto ao peso molecular das proteínas com resíduos de tirosina fosforilado e quais papéis estas exercem durante a capacitação e a reação acrossômica. A fosforilação das proteínas também pode ser observada em um espermatozóide individualmente por imunocitoquímica, a qual revela a compartimentalização das proteínas fosforiladas e a heterogeneidade da população espermática (URNER; SAKKAS, 2003).

Deste modo, a fosforilação do aminoácido tirosina das proteínas espermáticas é um importante mecanismo intracelular de regulação da capacitação espermática de mamíferos, servindo como um significativo indicador da evolução deste processo. Este mecanismo parece ser promovido pela ação de fatores auxiliares da capacitação como a proteína semelhante à albumina, o bicarbonato e o cálcio (VISCONTI et al., 1995; EMILIOZZI; FENICHEL, 1997; VISCONTI; KOPF, 1998; TARDIF et al., 2001; POMMER; MEYERS, 2002).

2.4 HIPERMOTILIDADE

O processo de capacitação espermática também envolve mudanças no padrão de motilidade, o qual é denominado de hiperativação (YANAGIMACHI, 1994). Este padrão de movimento é necessário para a progressão do espermatozóide na tuba uterina, permitindo a liberação do espermatozóide do epitélio do istmo (DEMOTT; SUAREZ, 1993) e promovendo a motilidade necessária para a penetração da zona pelúcida (SUAREZ; PACEY, 2006). A hiperativação é caracterizada por movimentos vigorosos do flagelo, marcante deslocamento lateral da cabeça do espermatozóide e presença de uma trajetória não progressiva (SUAREZ; KATZ; OVERSTREET, 1983).

A hiperativação deve ter seu início em lugar e momento apropriado para que o espermatozóide consiga realizar a fertilização. Seria provável que este local estivesse com líquido folicular e presença do *cumulus* para então iniciar a hiperativação, mas há evidências *in vivo* que estes fatores por si só não iniciam a hiperativação (HO; SUARES, 2001). Embora o líquido folicular seja encontrado na ampola da tuba uterina no momento da ovulação das porcas, somente < 1% permanece retido no lúmen da ampola (HANSEN et al., 1991).

A hiperativação tem sido considerada como parte no processo de capacitação; entretanto, há evidências (em bovinos) que a hiperativação é regulada separadamente ou por uma via de sinalização do Ca^{2+} divergente da que regula a reação acrossomal, tendo em vista, que a hiperativação ocorre mesmo quando é adicionado ao meio substâncias que bloqueiam a capacitação como o H-89, um inibidor da proteína quinase A (PKA) e o Rp-cAMPS, antagonista do cAMP (MARQUEZ; SUAREZ, 2004). Somando-se a estes achados, Colenbrander et al. (2001) descreveram que a porcentagem de células hiperativadas de uma determinada população de células com motilidade não teve mudanças quando induzidas a capacitação, concluindo que este movimento característico não pode ser usado na avaliação da capacitação.

O movimento característico apresentado pela célula espermática durante o fenômeno da hiperativação pode ser detectado pelas análises computadorizadas da motilidade (CASA – *Computer Assisted Sperm Analysis*). Este padrão de movimento é representado pelo aumento do ALH (amplitude do deslocamento lateral da cabeça) e do VCL (velocidade curvilínea) (WHITE; AITKEN, 1989; BURKMAN, 1991). Para a espécie

equina Rathi et al. (2001) propõem que o espermatozóide deve apresentar um VCL $\geq 180 \mu\text{m/s}$ e a ALH $\geq 12 \mu\text{m}$ para ser considerado hiperativado.

2.5 REAÇÃO ACROSSÔMICA

O oócito de todos os mamíferos eutérios é circundado por um revestimento glicoprotéico, a zona pelúcida, esta é circundada pelas células da granulosa oriundas do *cumulus oophorus* recém expandido (YANAGIMACHI, 1994). Antes de fertilizar o oócito, o espermatozóide deve passar pela zona pelúcida e, para isto acontecer, o espermatozóide tem que sofrer a reação acrossômica assim que se ligar a zona. A reação acrossômica é um evento irreversível de exocitose, caracterizado por um aumento repentino do influxo de Ca^{2+} para o interior da célula e fusão da membrana acrossomal externa com a membrana plasmática (GADELLA et al., 2001), deste modo, liberando as enzimas (hialuronidase, proacrosina, esterases, fosfolipase A_2 , fosfatases ácidas, aril-fosfatases, β -N-acetil glucosaminidase, aril amidase e proteínas ácidas não específicas) responsáveis pela lise da zona pelúcida (BAZER; GEISERT; ZAVY, 1995).

Nas células somáticas as SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins*) estão envolvidas no processo de fusão entre membranas responsáveis então pela secreção das células (SØRENSEN, 2005). As SNAREs foram identificadas como necessárias para a reação acrossômica de espermatozóides de mamíferos (DE BLAS et al., 2005). A regulação da formação dos complexos de fusão SNARE estão atualmente em estudo (GADELLA, 2008). O complexo protéico formado entre as ligações do espermatozóide com a zona pelúcida regulam as proteínas responsáveis pela fusão acrossomal. Um importante canal de K^+ foi identificado no complexo protéico formado entre as ligações do espermatozóide com a zona pelúcida (VAN GESTEL et al., 2007), o qual está indiretamente relacionado com o influxo de cálcio para o interior da cabeça do espermatozóide, sendo que este acontecimento é requerido pelas SNAREs para que estas se juntem e tenham mudanças na conformação para que então haja a fusão entre as membranas (GADELLA, 2008).

2.6 MUDANÇAS SEMELHANTES À CAPACITAÇÃO (CRIOCAPACITAÇÃO)

A criopreservação do sêmen é uma importante ferramenta para a reprodução assistida, embora a fertilidade do espermatozoíde criopreservado seja reduzida por danos, por vezes subletais e que não se encontram ainda elucidados por completo (BAILEY; BILOUDEAU; CORMIER, 2000; VISHWANATH; SHANNON, 2000).

Embora a base para explicar a menor fertilidade recaia no fato das amostras criopreservadas apresentarem uma menor motilidade, só a motilidade baixa não pode ser a única explicação, pois mesmo quando realizadas inseminações intra-cervicalmente com o mesmo número de espermatozoides móveis, a fertilidade do sêmen congelado é menor que no sêmen fresco (WATSON, 1995).

Pesquisas têm apontado que esta baixa fertilidade no sêmen criopreservado está associada às mudanças que se assemelham ao que ocorre durante a capacitação (criocapacitação) como a reorganização e aumento de fluidez da membrana plasmática e o influxo de cálcio para o interior da célula espermática (MAXWELL; JOHNSON, 1997; GREEN; WATSON, 2001; SCHEMBRI et al., 2002).

Fuller e Whittingham (1996) observaram que quase todos os espermatozoides apresentavam mudanças semelhantes à capacitação (criocapacitação) após a descongelação. As mudanças foram reveladas pelo aumento na proporção de células apresentando fluorescência no padrão B (células capacitadas) quando coradas com a sonda clortetraciclina (CTC). Somando-se a este resultado, sabe-se que as células criocapacitadas estão aptas a culminar com a reação acrossômica ou, até mesmo, fertilizar oócitos *in vitro* (PÉRES et al., 1996; CORMIER; SIRARD; BAILEY, 1997; GILLAN; EVANS; MAXWELL, 1997; MAXWELL; JOHNSON, 1997). Porém, estas células criocapacitadas não são capazes de se ligar ao epitélio da tuba uterina, para assim formarem o reservatório espermático. Deste modo, reduzindo o tempo de sobrevivência destas células no trato reprodutivo feminino (ABAD et al., 2006).

É importante salientar o que se encontra descrito no trabalho proposto por Neild et al. (2003). Estes autores ao associarem a CTC com a sonda Hoechst 33258, um corante impermeável a membrana plasmática e que se liga ao DNA das células com membrana plasmática lesada (não viáveis), observaram que as células consideradas não viáveis (positivo para o H3258) apresentavam todos os padrões exibidos pela técnica da CTC.

Estudos mais recentes realizados tanto na espécie suína (GREEN; WATSON, 2001; BRAVO et al., 2005) como eqüina (THOMAS; MEYERS; BALL, 2006) têm demonstrado que apesar das células refrigeradas (5°C) ou criopreservadas apresentarem como resultado final aspectos semelhantes a uma célula capacitada as vias intracelulares são distintas, tendo em vista, os diferentes padrões de fosforilação dos resíduos de tirosina.

Deste modo, conhecimentos sobre os processos que resultam/ou não na capacitação prematura do espermatozóide eqüino durante a criopreservação são imprescindíveis para a obtenção de uma boa taxa de fertilidade, bem como dos mecanismos para prevenir ou atrasar estas mudanças.

2.7 PLASMA SEMINAL

O plasma seminal é uma mistura de secreções produzidas nos testículos, epidídimos e pelas glândulas sexuais acessórias, sendo importante em múltiplas funções que envolvem os eventos que precedem a fertilização (KARESKOSKI; KATILA, 2008). Existem vários componentes orgânicos e inorgânicos no plasma, como aminoácidos, proteínas, íons (Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , entre outros), bicarbonato, frutose, sorbitol, inositol, ergotionina, glicerilfosforilcolina, ácido cítrico, ácido ascórbico, lipídios, enzimas, antimicrobianos, imunoglobulinas e uma variedade de substâncias hormonais, todos em quantidades variadas (GARNER; HAFEZ, 2004).

As secreções do trato reprodutivo não são descarregadas simultaneamente durante a ejaculação. Desta maneira, o ejaculado do garanhão consiste de seis a nove frações, com cerca de 70 % dos espermatozóides nos três primeiros jatos do ejaculado (KARESKOSKI; KATILA, 2008).

O volume do ejaculado do garanhão é 10 a 20 vezes maior do que de touros, e 50 a 100 vezes maior do que o do carneiro, porém o número total de espermatozóides por ejaculado é similar nas três espécies. Assim, a contribuição do plasma seminal no sêmen do garanhão é muito maior do que no touro ou carneiro (VARNER, 1987).

O plasma seminal possui em sua constituição substâncias moduladoras da inflamação uterina, estas substâncias auxiliam na eliminação dos espermatozóides e na limpeza uterina de éguas susceptíveis a endometrite. Ainda, durante a inflamação,

algumas proteínas seminais protegem os espermatozóides viáveis, enquanto outras facilitam a fagocitose de espermatozóides danificados (ALGHAMDI; FOSTER; TROEDSSON, 2004; TROEDSSON et al., 2005). Prostaglandinas ($\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE) e estrógenos presentes no plasma seminal podem auxiliar no transporte do espermatozóide (TROEDSSON et al., 2005), assim como a ocitocina (KATILA, 2001).

Em geral, considera-se que a capacitação tem seu início com a remoção do plasma seminal com todas as suas substâncias (incluindo as chamadas substâncias decapacitantes), o que leva a uma reorganização da membrana plasmática e do metabolismo intracelular (COLENBRANDER et al., 2002). Por este motivo, foram realizadas diversas tentativas de purificação dos fatores presentes no plasma seminal. Os achados levaram a diferentes conclusões sobre a natureza destes fatores que podem ser lipídicas como o colesterol ou protéicas. As diversas substâncias atuam no espermatozóide ligando-se aos receptores, estabilizando a membrana plasmática, ou limitando o influxo de cálcio (ZANEVELD et al., 1991; FRASER; MCDERMOTT, 1992; CROSS, 1993; EMILIOZZI; FENICHEL, 1997). Apesar de não se saber, exatamente, quais os fatores presentes no plasma seminal que sensibilizam ou promovem a resistência espermática, deve-se considerar a presença de proteínas seminais, que interajam com a membrana plasmática (MOORE; HALL; HIBBIT, 1976). Até o momento, sabe-se que as proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (Fn-2), proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISP), e espermiodesinas formam os quatro maiores grupos de proteínas do plasma seminal equino (KARESKOSKI; KATILA, 2008).

Os fluidos epididimários e seminal e as vesículas membranosas (epididiosomos e prostassomos) têm sido considerados como inibidores da capacitação por inserirem fatores decapacitantes na superfície espermática, os quais previnem que o espermatozóide responda adequadamente ao estímulo da capacitação. Para a fertilização *in vitro* (FIV), o espermatozóide é lavado através de um meio com diferentes gradientes de densidade e colocado em um meio semelhante ao fluido da tuba uterina, estes procedimentos com o intuito de mimetizar a retirada dos fatores decapacitantes que ocorrem naturalmente no trato reprodutivo da fêmea para então ocorrer a fertilização (SOSTARIC et al., 2008).

O plasma seminal contém mecanismos antioxidantes que evitam os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio (POTTS; NOTARIANNI; JEFFERIES, 2000; MARQUES et al., 2002). O sêmen contém uma alta concentração de ascorbato, urato e

grupos tiol, além de uma pequena quantia de glutathiona (GSH) e α -tocoferol (LI, 1975; LEWIS et al., 1997; OCHSENDORF et al., 1998). E mais as enzimas antioxidantes catalase, superóxido-dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX), e glutathiona redutase (GRD) (SANOCCA et al., 1996; ALKAN et al., 1997; YEUNG et al., 1998). Sendo ainda encontradas, apesar de quase irrisórias, concentrações de antioxidantes no próprio espermatozóide (ALVAREZ; STOREY, 1989; AITKEN; FISHER, 1994;).

A existência de diferentes componentes no plasma seminal, relacionados com a capacidade do espermatozóide apresentar melhora na motilidade após a refrigeração ou congelação, vem sendo estudada. Barrios et al. (2000), trabalhando com carneiros, notaram a possibilidade de reversão dos efeitos do “choque frio” pela adição de plasma seminal autólogo, após reaquecimento da amostra refrigerada. Estes autores atribuíram até 50% dos efeitos de reversão dos danos a uma faixa de proteínas com aproximadamente 20 kDa presentes no plasma seminal.

Sabe-se ainda, que congelabilidade do sêmen varia entre garanhões e até mesmo em diferentes ejaculados de um mesmo animal e que é possível aumentar o número de espermatozoides com motilidade quando adicionado plasma seminal de animais que apresentam boa resposta à congelação ao sêmen daqueles que apresentam espermatozoides com baixa capacidade de congelação (AURICH et al., 1996).

É importante salientar que antes de submeter o sêmen equino à congelação realiza-se a centrifugação. Este procedimento é necessário para a retirada da maior parte do plasma seminal, pois este contém altas concentrações de cloreto de sódio, prejudicial aos espermatozoides durante a criopreservação (NISHIKAWA, 1975), e para promover o aumento da concentração dos espermatozoides, o qual é essencial para permitir o envasamento (NEVES NETO, 2004).

Ressalta-se que a adição do plasma seminal ao sêmen pós-descongelação tem a capacidade de reduzir a criocapacitação já que reduz o número de espermatozoides capacitados e/ou com acrossomo reagido em humanos e carneiros (HAN et al., 1990; CROSS, 1993; GUTHRIE; MAXWELL; JOHNSON, 2000) e leva a uma melhora na viabilidade e motilidade dos espermatozoides (GUTHRIE; MAXWELL; JOHNSON, 2000). A melhora destas características são refletidas na obtenção de melhores resultados nos índices de prenhez em inseminações com sêmen criopreservado de carneiros (MAXWELL et al., 1999), ou seja, a criocapacitação e os efeitos deletérios da refrigeração podem ser revertidos com a adição de plasma seminal autólogo ao sêmen descongelado

ou submetido à refrigeração (CROSS, 1993; BARRIOS et al., 2000; GUTHRIE; MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Vadnais et al. (2005) citam a necessidade de haver mais experimentos com o intuito de identificar todos os constituintes do plasma seminal e seus mecanismos de ação *in vitro* e *in vivo*. Embora, seja evidente que alguns constituintes do plasma seminal atuam no processo de criocapacitação com potencial de prevenir ou aparentemente reverter o processo, melhorando a fertilidade do sêmen criopreservado.

2.8 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA CAPACITAÇÃO E NA CRIOCAPACITAÇÃO

O espermatozóide, como qualquer outra célula em condições aeróbias, produz espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo a maior parte delas originadas do metabolismo normal da célula. Dentre as EROs formadas, podemos citar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os radicais hidroxil ($OH^{\cdot}$), hidroperoxil ($HO_2^{\cdot}$), peroxil ($ROO^{\cdot}$) e alcoxil ($RO^{\cdot}$), e ainda o ácido hipocloroso (HOCL) (AITKEN, 1995; DE LAMIRANDE et al., 1997; DE LAMIRANDE; O'FLAHERTY, 2008).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) estão entre os fatores associados à criocapacitação, já que como foi determinado por Wang et al. (1997) estes aumentam significativamente durante as etapas da criopreservação. Durante o processo de capacitação espermática, uma baixa produção de espécies reativas de oxigênio é suficiente para que ocorra a geração do cAMP, que irá levar a um aumento da fosforilação do aminoácido tirosina através da estimulação da proteína quinase A (AITKEN et al., 1995; VISCONTI et al., 1995; AITKEN et al., 1998; AITKEN et al., 2004; DE LAMIRANDE; O'FLAHERTY, 2008). Caso as espécies reativas de oxigênio sejam eliminadas, a produção de cAMP é inibida e o evento da capacitação é suspenso (AITKEN et al., 1998; LEWIS; AITKEN, 2001; AITKEN et al., 2004). Alternativamente, se uma intensa atividade redox for induzida no espermatozóide de mamíferos, a geração de cAMP e a fosforilação da tirosina são aumentadas, indicando a capacitação (AITKEN et al., 1998; LEWIS; AITKEN, 2001; AITKEN et al., 2004).

Além do mais, o excesso de produção das espécies reativas de oxigênio está associado ao decréscimo da motilidade, as anormalidades morfológicas e a baixa

capacidade do espermatozóide em penetrar no oócito (AITKENS; CLARKSON, 1987; AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989; AITKEN; FISHER, 1994).

A peroxidação lipídica dos ácidos graxos poli-insaturados, por ação do excesso de espécies reativas de oxigênio, diminui a fluidez e aumenta a rigidez da membrana plasmática, simultaneamente aos peróxidos lipídicos gerados neste processo e seus produtos de degradação, como o malondialdeído (MDA). Estes metabólitos podem inibir várias enzimas e funções espermáticas, incluindo a função mitocondrial com a perda da motilidade (ZHENG; ZHANG, 1997; OLIVEIRA, 2003). Previamente, a detecção da peroxidação lipídica ocorrida na membrana espermática era baseada na mensuração dos produtos finais deste processo, seja através da mensuração do malondialdeído ou do 4-hidroxiálquenois (GOMES; IRVINE; AITKEN, 1998; NICHII, 2003).

Deve ser compreendido que as formações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) provenientes das reações ocorridas com os fosfolipídios da membrana necessitam de sucessivas reações químicas e de produtos intermediários formados durante estas reações, por exemplo, hidroperóxidos lipídeos, -epóxidos, -endoperoxidos, estes produtos sendo moléculas que podem reagir com outras substâncias além dos TBARS. Os exemplos mais bem conhecidos de rotas alternativas são as reduções enzimáticas dos fosfolipídios hidroperóxidos pela enzima fosfolipídio hidroperóxido glutathione peroxidase (BROUWERS; GADELLA, 2003).

A sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591} supre as limitações das técnicas baseadas nas TBARS. Esta sonda é um análogo dos ácidos graxos poliinsaturados sendo prontamente incorporada à membrana celular, e sua reatividade à peroxidação é comparável a dos ácidos graxos poliinsaturados, encontrados em abundância nas membranas das células espermáticas. Ao ter contato com as espécies reativas de oxigênio, a fluorescência desta sonda muda irreversivelmente da cor vermelha para a verde, por este motivo vem sendo usada para acessar a peroxidação lipídica e a oxidabilidade de células vivas. Na literatura encontra-se esta sonda descrita para a análise da peroxidação das membranas plasmáticas de células do miocárdio, fibroblastos, e espermatozóides bovinos e eqüinos (PAP et al., 1999; BALL; VO, 2002; BROUWERS; GADELLA, 2003; RAPHAEL et al., 2008).

3 HIPÓTESES

3 HIPÓTESES

1. O processo de criopreservação do sêmen eqüino provoca na célula espermática mudanças semelhantes às ocorridas no evento da capacitação (criocapacitação) e aumento na produção das espécies reativas de oxigênio.
2. O processo de criopreservação do sêmen eqüino provoca na célula espermática mudanças no padrão da motilidade que se assemelham a hiperativação.
3. A adição de plasma seminal ao sêmen descongelado reduz os efeitos da criocapacitação e a geração de espécies reativas de oxigênio.
4. O plasma seminal oriundo de garanhões com boa congelabilidade e fertilidade tem maior capacidade de reduzir os efeitos da criocapacitação e a produção de espécies reativas de oxigênio.
5. A manutenção da viabilidade espermática é prejudicada pela adição de plasma seminal.

4 OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

Com base na literatura apresentada e nas hipóteses formuladas, o experimento foi realizado com os seguintes objetivos:

- Avaliar o efeito da técnica de criopreservação do sêmen equino nas mudanças semelhantes à capacitação (criocapacitação) geradas nas membranas espermáticas e nas características de motilidade, e no incremento da produção das espécies reativas de oxigênio;

- Verificar se há diminuição da criocapacitação, redução da porcentagem de células hiperativadas e diminuição da peroxidação das membranas espermáticas quando adicionado plasma seminal autólogo ou homólogo (oriundo de garanhões de boa congelabilidade e fertilidade comprovada) ao sêmen pós-descongelação;

- Verificar se há prejuízos na manutenção da viabilidade espermática quando são adicionados 20 % de plasma seminal (v/v), autólogo ou homólogo, ao sêmen descongelado.

5 MATERIAL E MÉTODO

5 MATERIAL E MÉTODO

Nesta seção encontram-se descritas as metodologias empregadas no presente experimento, bem como o delineamento experimental.

5.1 LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia do 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 fevereiro a outubro de 2008.

5.2 ANIMAIS

Foram utilizados quatro garanhões dos quais foram obtidos 5 ejaculados para a realização do experimento. Os animais foram submetidos a manejo nutricional e sanitário idênticos e ficavam alojados na dependência do Setor de Equideocultura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS-USP).

5.3 COLHEITA E AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

As colheitas do sêmen foram realizadas com vagina artificial, modelo Missouri, sendo a fração gelatinosa devidamente separada e descartada. Em seguida o sêmen *in natura* foi avaliado (Figura 1) quanto às características da motilidade usando o aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser (HTM-IVOS, Version 12.3, Hamilton Thorn Research, Beverly, Massachusetts, USA), de acordo com a metodologia descrita por Arruda (2000) e submetido aos protocolos de coloração para a análise por citometria de fluxo (conforme descrito nos itens 5.7, 5.8, 5.9, 5.10, 5.11 e 5.12).

5.4 CONGELAÇÃO DO SÊMEN

Realizadas as análises iniciais do sêmen (*in natura*) este foi diluído 1:1 (sêmen:diluidor) em meio à base de leite desnatado (Botu-Sêmen®-Biotech-Botucatu-Ltda/ME, Botucatu, São Paulo, Brasil) para posterior centrifugação. Após a centrifugação, os sedimentos obtidos foram suspensos com diluidor para congelação (Botu-Crio®- Biotech-Botucatu-Ltda/ME, Botucatu, São Paulo, Brasil), a fim de se obter uma concentração final de 200×10^6 espermatozoides/mL. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL (IMV Internacional, St. Paul, Minesota, USA) e então submetidos à congelação.

A criopreservação do sêmen foi realizada utilizando um sistema automático (TK 3000®, TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Minas Gerais, Brasil), composto por um aparelho programável, equipado com um porta-palhetas, um compartimento de refrigeração e uma caixa térmica para nitrogênio líquido. Para a refrigeração, as palhetas foram colocadas no porta-palhetas, o qual foi acondicionado ao compartimento de refrigeração, permanecendo neste até alcançar 5°C, obedecendo uma curva de refrigeração de -0,25°C/minuto, com duração aproximada 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 -20°C/minuto de 5°C 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.

5.5 OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DO PLASMA SEMINAL

O plasma seminal homólogo foi obtido em colheita prévia de um garanhão que apresentava boa qualidade seminal e fertilidade comprovada. O garanhão apresentou índice de fertilidade, com o uso de sêmen congelado, superior a 50 % por ciclo na estação de monta de 2007/2008. Esse animal pertencia ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina (CERBEQ) do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP. O plasma seminal autólogo foi adquirido de colheitas prévias realizadas dos quatro garanhões que participaram do experimento.

Após a colheita o sêmen dos garanhões pertencentes a ambos os grupos foi centrifugado a $3000 \times g$ por 20 minutos. O sobrenadante livre de espermatozoides foi retirado filtrado em membranas com $0,22 \mu\text{m}$ e então estocado a -196°C em botijão criogênico para futura utilização.

5.6 DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN E DISTRIBUIÇÃO NOS TRATAMENTOS

Descongelou-se quatro palhetas de cada partida em banho-Maria a 37°C por 30 segundos. O sêmen descongelado foi então homogeneizado. Em seguida, retirou-se uma amostra para as análises laboratoriais do sêmen pós-descongelação (Figura 1). Em seguida, o sêmen remanescente foi dividido em três tratamentos, a saber: DIL - adicionado de diluidor de congelção sem crioprotetor, PA - adicionado de plasma seminal autólogo, PH - adicionado de plasma seminal homólogo (Figura 1). Todas as amostras foram diluídas nos respectivos tratamentos até a obtenção de uma concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL.

As amostras diluídas, em plasma seminal autólogo e homólogo tiveram uma concentração final de 20 % (v/v) de plasma seminal (diluidor de congelação sem crioprotetor + plasma seminal), como determinado em experimento prévio (ANDRADE et al., 2007). Andrade et al. (2007) obtiveram uma equação do 2º que permitiu a obtenção da dose ideal de plasma seminal a ser adicionado. A dose encontrada foi de 22,29 % (v/v), porém para fins práticos a dose teve seu valor arredondado para 20 % (v/v).

Após a adição dos tratamentos as amostras permaneceram em banho-Maria a temperatura de 37°C até o final das análises (120 minutos). Ressalta-se, que antes do início das avaliações, as amostras permaneceram por cinco minutos em contato com os tratamentos, permitindo assim uma maior interação entre o tratamento administrado e o espermatozóide. Os grupos experimentais foram avaliados em três períodos distintos, a saber: 0 (após os 5 minutos de incubação com o tratamento), 60 e 120 minutos. A análise aos 120 minutos visou mimetizar o período em que, naturalmente, os espermatozoides depositados no útero atingem a tuba uterina (BADER, 1982; FIALA et al., 2007).

Figura 1 – Esquema Experimental

5.7 AVALIAÇÃO DA REAÇÃO ACROSSOMAL POR CITOMETRIA DE FLUXO

Uma alíquota foi retirada das amostras e adicionada ao TALP *sperm* (BAVISTER; LEIBFRIED; LIEBERMAN, 1983) modificado (TALPm, Anexo A) em tubos de microcentrifugação (1,5 mL) pré-aquecidos a 37°C, a fim de se obter amostras com concentração de 5×10^6 espermatozóides por mL em um volume final de 148 μ L. A seguir, adicionou-se 2 μ L de Hoechst 33342 (H33342; 40 μ g/mL, H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. O uso desta sonda teve como objetivo, corar o DNA das células espermáticas para que não houvesse a contagem de forma equivocada de partículas com o mesmo tamanho e granulidade do espermatozóide. Passado o período de incubação, foram adicionados a amostra 3 μ L de Iodeto de Propídio (IP-0,5 mg/mL, L0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA), conjuntamente com a adição de 10 μ L de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA-100 μ g/mL, L-0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) estas sondas com os seguintes objetivos; corar as células com membrana plasmática lesada (IP positivo) (CELEGHINI et al., 2007; ANDRADE et al., 2007) e com a membrana acrossomal reagida (FITC-PSA positivo). Após 10 minutos de incubação a 37°C, os espermatozóides foram diluídos com a adição de 150 μ L de TALPm e transferidos para tubos graduados até 15 mL (37°C). Com isso, as amostras apresentavam uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozóides por mL no momento de serem analisadas pela técnica de citometria de fluxo. Todas as amostras tiveram 10.000 células analisadas. O gráfico 1 apresenta um exemplo de gráfico de pontos gerados pelo *software* BD FACSDiva 6.0 após a contagem da amostra. A coloração com FITC-PSA diferenciou a população espermática viável (IP-negativo) em dois grupos distintos (Gráfico 1). Os espermatozóides que não se apresentavam corados com FITC-PSA, estes sendo os que possuíam a membrana acrossomal intacta (AIMPI-Gráfico 1), ou os positivos para a coloração com FITC-PSA indicando que estes espermatozóides ou possuíam o acrossomo em processo de exocitose ou já estavam reagidos (ARMPI).

AIML-membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida.
 ARML-membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida.
 AIMI-membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida.
 ARMI-membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida.

Gráfico 1 - Gráfico de pontos gerado pela análise de 10.000 células por citometria de fluxo. Amostra corada com a associação H33342, IP, FITC-PSA permitindo a classificação dos espermatozoides eqüinos em quatro categorias – Pirassununga – 2009

5.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO

Uma alíquota foi retirada das amostras e adicionada ao TALPm (Anexo A) em tubos de microcentrifugação (1,5 mL), pré-aquecidos a 37°C. Deste modo, foram obtidas amostras com concentração de 5×10^6 espermatozoides por mL em um volume final de 144 μ L. A seguir, 6 μ L de JC-1 (153 μ M, T-3168, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) foram adicionados às amostras. Após 10 minutos de incubação a 37°C, os espermatozoides foram diluídos com a adição de 150 μ L de TALPm e transferidos para tubos graduados até 15 mL (37°C). Com isso, as amostras apresentavam uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides por mL no momento de serem analisadas pela técnica de citometria de fluxo. Todas as amostras tiveram 10.000 células analisadas. No gráfico 2 está apresentado um exemplo de gráfico de pontos gerados pelo *software*

BD FACSDiva 6.0 após a contagem da amostra. A marcação com a sonda JC-1 permite a classificação das células em três categorias, a saber (Gráfico 2): 1-com alto potencial de membrana mitocondrial (AP), 2-com médio potencial de membrana mitocondrial (MP) e 3-com baixo potencial de membrana mitocondrial (BP). Ressalta-se que para fins da análise estatística considerou-se a somatória das células com potencial de membrana mitocondrial (CP sendo que $CP=AP+MP$).

Gráfico 2 - Gráfico de pontos gerado pela análise de 10.000 células por citometria de fluxo. Amostra corada com a sonda JC-1 permitindo a classificação dos espermatozoides eqüinos em três categorias – Pirassununga - 2009

5.9 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO DAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Foram retiradas alíquotas de sêmen durante as etapas de análise (Figura 1) a fim de obter amostras diluídas em TALPm (Anexo A) com 5×10^6 espermatozoides/mL e com um volume final de 499,5 μ L. Estas foram então coradas com 0,5 μ L da sonda C11-BODIPY^{581/591} (1 mg/mL, D-3861, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) por 30

minutos a 37°C. Passado o período de incubação, foi transferida para outro microtubo 145 µL desta solução, agora, corada com a sonda C11-BODIPY^{581/591}. A esta amostra foi adicionado 2 µL de Hoechst 33342 (40 µg/mL, H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. O uso desta sonda teve como objetivo, corar o DNA das células espermáticas para que não houvesse a contagem de forma equivocada de partículas com o mesmo tamanho e granulosidade do espermatozóide. Então, adicionou-se a amostra 3 µL de Iodeto de Propídio (0,5 mg/mL, L0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) a fim de servir como um marcador das células com membrana plasmática lesada. Após 5 minutos de incubação a 37°C, os espermatozoides foram diluídos com a adição de 150 µL de TALPm e transferidos para tubos graduados de 15 mL (37°C). Com isso, as amostras apresentavam uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides por mL no momento de serem analisadas por citometria de fluxo. Foram analisadas 10.000 células por amostra. O gráfico 3a apresenta um exemplo de gráfico de pontos e de um histograma gerados pelo *software* BD FACSDiva 6.0 após a contagem da amostra. As células viáveis (IP negativo) e coradas com a sonda C11-BODIPY^{581/591} foram analisadas quanto à média da emissão de fluorescência captada no fotomultiplicador com *long pass* de 502 e *band pass* de 530 ± 15 nm (Gráfico 3b), esta faixa captada corresponde às células que estão sofrendo ação da peroxidação.

Gráfico 3 - Gráfico de pontos (A) gerado pela análise por citometria de fluxo em amostra corada com a associação das sondas fluorescentes C11-BODIPY, H33342 e IP. No gráfico de pontos podem-se observar duas categorias distintas, sendo que o quadrante MPI contém os espermatozoides equinos com a membrana plasmática íntegra e selecionados para a avaliação da intensidade da peroxidação das membranas. O histograma (B) apresenta a população selecionada MPI que está sendo analisada quanto à distribuição da fluorescência captada no fotomultiplicador com *band pass* de 530 ± 15 nm (células com peroxidação lipídica). O valor obtido é indicado no quadro como a média e a mediana em unidades arbitrárias (ua) – Pirassununga - 2009

5.10 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE (FLUIDEZ) DA MEMBRANA PLASMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a análise da estabilidade da membrana plasmática pela técnica de citometria de fluxo (FLESCH et al., 1999; RATHI et al., 2001), as amostras foram incubadas em solução de TALPm (Anexo A) na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL em um volume final de 147 μ L. Foram então adicionados 2 μ L de Hoechst 33342 (40 μ g/mL, H-

1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. O uso desta sonda teve como objetivo, corar o DNA das células espermáticas para que não houvesse a contagem de forma equivocada de partículas com o mesmo tamanho e granulosidade do espermatozóide. Em seguida 0,5 µL a sonda fluorescente Yo-Pro-1 foi adicionada a amostra (7,5 µM-Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) obtendo-se uma concentração final de 25 nM. O Yo-Pro-1 é impermeável a membrana plasmática íntegra, se ligando ao DNA das células com a membrana plasmática lesada. Então, a amostra foi incubada por 20 minutos para posteriormente ser adicionada da sonda fluorescente merocianina 540 (810 µM-Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) a fim de se obter uma concentração de 2,7 µM em uma solução final de 150 µL, em seguida estas foram incubadas por 70 segundos. Foram então diluídas em 150 µL de TALPm e analisadas por citometria de fluxo, no qual foi avaliado as porcentagens de espermatozóides viáveis (Yo-Pro-1 negativo) com aumento na desordem da bicamada lipídica (Merocianina 540 positivo). O gráfico 4 apresenta um exemplo de gráfico de pontos gerados pelo *software* BD FACSDiva 6.0 após a contagem da amostra. A coloração com Merocianina 540 mostrou duas populações distintas de células viáveis (Yo-Pro-1 negativa), uma que é caracterizada pelas células com emissão de baixa fluorescência e outra que é caracterizada por alta (captado no *long pass*-595 e *band-pass*-610/20). Os espermatozóides com baixa emissão de fluorescência são considerados não capacitados, enquanto que as células que apresentam alta emissão de fluorescência são caracterizadas como capacitadas (alto grau de desorganização da bicamada lipídica; Gráfico 4).

NCMPI- espermatozóide não capacitado com membrana plasmática íntegra.
 MPL- espermatozóide com membrana plasmática lesada.
 CAPAC- espermatozóide capacitado e com membrana plasmática íntegra.

Gráfico 4 - Gráfico de pontos gerado pela análise por citometria de fluxo, neste caso as células foram coradas com a associação do H33342, Yo-Pro-1 e da Merocianina 540 permitindo a classificação dos espermatozoides eqüinos em três categorias – Pirassununga - 2009

5.11 DETECÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO DA FOSFORILAÇÃO DO AMINOÁCIDO TIROSINA PRESENTE NA SUPERFÍCIE DA MEMBRANA PLASMÁTICA

As amostras de sêmen foram diluídas em TALPm (Anexo A) a fim de se obter uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL em um volume final de 141 μ L. Foram então adicionados 2 μ L de Hoechst 33342 (40 μ g/mL, H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado 6 μ L do anticorpo antifosfotirosina conjugado a uma fluoresceína (100 μ g/mL-CLONE PY-20, F0426, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) a esta suspensão, obtendo-se uma concentração final de 2 μ g/mL de anticorpo. Neste mesmo momento foi adicionado à amostra 3 μ L de Iodeto de Propídio (0,5 mg/mL, L0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) a fim de retirar da análise as células que apresentavam lesão na membrana plasmática. Em seguida a amostra foi incubada por 5 minutos a 37°C para então ser submetida à análise por citometria de fluxo (ANDRADE et

al., 2008). O gráfico 5a apresenta um exemplo de gráfico de pontos e de um histograma gerados pelo *software* BD FACSDiva 6.0 após a contagem da amostra. As células viáveis (IP negativo) e marcadas com o anticorpo antifosfotirosina foram analisadas quanto à média da emissão de fluorescência captada no fotomultiplicador com *long pass* de 502 e *band pass* de 530 ± 15 (Gráfico 5b), esta faixa captada corresponde às células que estão marcadas pelo anticorpo.

Gráfico 5- Gráfico de pontos (A) gerado pela análise por citometria de fluxo em amostra corada com a associação de H33342, com anticorpo antifosfotirosina conjugado ao FITC e a sonda fluorescente IP. No gráfico de pontos podem-se observar duas categorias distintas, sendo a MPI os espermatozoides eqüinos com a membrana plasmática íntegra e selecionados para a avaliação da detecção dos resíduos de tirosina presentes na superfície da célula. O histograma (B) apresenta a população selecionada MPI que está sendo analisada quanto à distribuição da fluorescência captada no fotomultiplicador com *band pass* de 530 ± 15 nm (células marcadas com o anticorpo antifosfotirosina). O valor obtido é indicado no quadro como a média e a mediana em unidades arbitrárias (ua) – Pirassununga - 2009

5.12 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DAS CARACTERÍSTICAS DA MOTILIDADE E DETECÇÃO DA POPULAÇÃO HIPERATIVADA

Com a finalidade de examinar o padrão de motilidade dos espermatozóides antes e após a criopreservação, e nos diferentes tratamentos, as amostras foram examinadas pelo sistema de análise computadorizada do sêmen (CASA) usando o aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser (HTM-IVOS, Versão 12.3, Hamilton Thorn Research, Beverly, Massachusetts, USA, Figura 2), sendo que para a análise do movimento espermático utilizou-se o programa *Animal Motility*. Foram previamente realizados ajustes (*set up*) no equipamento para a análise do sêmen eqüino (Anexo B) e escolha manual do campo de leitura e análise, sendo selecionados no mínimo 5 campos por amostra. As características analisadas foram: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %); cujas definições foram descritas por Arruda (2000). Conjuntamente a estas análises realizou-se o ajuste da ferramenta *Edit/Sort*, usada para avaliar a porcentagem de

Figura 2 - HTM-IVOS, Versão 12.3, Hamilton Thorn Research, Beverly, Massachusetts, USA. (Proc. FAPESP-05/60591-6)

células hiperativadas na amostra. O espermatozóide eqüino foi considerado como hiperativado quando este apresentava $VCL \geq 180 \mu\text{m/s}$ e um $ALH \geq 12 \mu\text{m}$, assim como descrito por Rathi et al. (2001).

5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os efeitos obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados com prévia verificação da normalidade dos resíduos e da homogeneidade das variâncias. As variáveis dependentes não atenderam às premissas estatísticas, então foram submetidas à transformação em arco-seno. Os dados transformados foram submetidos à análise de variância (PROC GLM), empregando-se o programa SAS (1998). Às análises estatísticas destas variáveis foram ainda adicionadas do fator medidas repetidas no tempo, referentes aos três momentos de amostragem. As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS). As análises dentro de cada tempo foram realizadas pelo teste de Fisher (LSD). As hipóteses testadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

As tabelas da análise de variância estão representadas a seguir, sendo a primeira usada na análise do efeito da criopreservação (Tabela 2) e a segunda usada para verificar o efeito dos tratamentos em função do tempo (Tabela 3).

Tabela 2 - Análise de variância para delineamento com 2 tratamentos, 4 garanhões – Pirassununga - 2009

Fonte de Variação	Grau de Liberdade
Tratamento	1
Garanhão (Bloco)	3
Resíduo	35
Total	39

Tabela 3 - Análise de variância para delineamento com 3 tratamentos, 4 garanhões e 3 diferentes tempos de amostragem – Pirassununga - 2009

Fonte de Variação	Grau de Liberdade
Tratamento	2
Garanhão (Bloco)	3
Resíduo A	54
Parcela	59
Tempo	2
Tempo*tratamento	4
Tempo*bloco	6
Resíduo B	108
Sub-parcela	179

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

Nesta seção encontram-se descritos os resultados obtidos no presente experimento.

6.1 EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE AS CÉLULAS ESPERMÁTICAS

Neste tópico serão apresentados os resultados do efeito da técnica de criopreservação sobre as mudanças semelhantes à capacitação.

6.1.1 EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NA REAÇÃO ACROSSÔMICA

Após a descongelação das amostras verificou-se que não houve aumento ($p>0,05$) no número de espermatozóides viáveis com membrana acrossomal reagida (ARMI) em relação ao sêmen *in natura* (Gráfico 6), o que houve foi uma redução ($p<0,05$) das células com membrana plasmática íntegra (MI – valor da somatória das populações ARMI e AIMI). A categoria de células considerada viável mas com a membrana plasmática reagida (ARMI) teve uma redução significativa ($p<0,05$) após o processo de criopreservação das células. A população de células com a membrana acrossomal e plasmática íntegras (AIMI) teve uma redução de aproximadamente 46,68 % enquanto que a categoria ARMI apresentou uma redução de 72,97 %.

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

Gráfico 6- Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) com membrana acrossomal íntegra e membrana plasmática íntegra (AIMI), células com acrossoma reagido e membrana plasmática íntegra (ARMI), células com membrana acrossomal íntegra (MAI) e células com membrana plasmática íntegra (MPI) no sêmen equino *in natura* e pós-descongelamento – Pirassununga - 2009

6.1.2 EFEITO DE CRIOPRESERVAÇÃO NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Foram considerados espermatozoides com potencial de membrana mitocondrial as células pertencentes, no momento da análise por citometria de fluxo, aos quadrantes de alto e médio potencial de membrana mitocondrial (Gráfico 2-item 5.8). Como resultado, observou-se que a criopreservação leva a uma redução ($p < 0,05$) na população de células com potencial de membrana mitocondrial (Gráfico 7).

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

Gráfico 7 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) com potencial de membrana mitocondrial (CP) no sêmen equino *in natura* e pós-descongelamento – Pirassununga - 2009

6.1.3 CONSEQÜÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A PEROXIDAÇÃO DAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS

Houve um aumento ($p < 0,05$) na intensidade da fluorescência captada pelo fotomultiplicador com *Band pass* de 530 ± 15 (Gráfico 8), este resultado corresponde a uma maior peroxidação das membranas dos espermatozóides viáveis após todo o processo que envolve a congelamento do sêmen equino. (aumento de aproximadamente 1,74 vezes).

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

Gráfico 8 - Médias $\pm$ erros padrão dos valores lineares médios da intensidade da fluorescência da população espermática com membrana plasmática íntegra e coradas com a sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591} (IFPERMI) no sêmen equino *in natura* e pós-descongelamento. Os valores estão representados em unidades arbitrárias (ua) – Pirassununga - 2009

6.1.4 CONSEQUÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO NA ESTABILIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA

A associação das sondas H33342, Yo-Pro-1 e Merocianina 540 ao ser analisada pela citometria de fluxo deu origem a três subpopulações distintas (Gráfico 4-item 5.10): células coradas com o Yo-Pro-1, sem estar positiva para a Merocianina 540 (células com membrana plasmática lesada e consideradas inviáveis, quadrante MPL), células não coradas com o Yo-Pro-1 (células com a membrana plasmática íntegra e consideradas viáveis) com baixo sinal de fluorescência para a Merocianina 540 (células não capacitadas, quadrante NCMPI) e células com alto sinal de fluorescência para a Merocianina 540 mas com baixo sinal de fluorescência para o Yo-Pro-1 (células viáveis consideradas capacitadas, já que possuem uma alta desorganização de sua bicamada lipídica, quadrante CAPAC). O sêmen descongelado apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de células negativas para o corante YO-PRO-1 (Gráfico

9). A população considerada não capacitada (NCAP) teve uma diminuição de 52,91 % de células apresentando integridade na estrutura da membrana plasmática. Já a população positiva para o corante Merocianina 540 apresentou uma queda de 82,91 % evidenciando assim a maior fragilidade ao processo de criopreservação nos espermatozóides capacitados.

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

Gráfico 9 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) viáveis não capacitadas (NCAP) e células viáveis capacitadas (CAP) no sêmen equino *in natura* e pós-descongelamento – Pirassununga - 2009

6.1.5 EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NA FOSFORILAÇÃO DOS RESÍDUOS DE TIROSINA PRESENTES NA SUPERFÍCIE DO ESPERMATOZÓIDE

As amostras de sêmen descongeladas apresentaram em média um aumento na emissão da intensidade de fluorescência (IFMPIANT- $p < 0,05$) o que significa que houve um aumento na ligação do anticorpo antifosfotirosina na superfície da membrana plasmática do espermatozóide criopreservado. Os valores no sêmen descongelado (Gráfico 10) foram 5,20 vezes maiores do que os encontrados nas amostras *in natura*.

Ressalta-se que a esta análise foi associada a sonda IP a fim de excluir as células com membrana plasmática lesada, evitando assim contagem de células com a membrana plasmática lesada.

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

Gráfico 10 - Médias $\pm$ erros padrão dos valores lineares médios da intensidade da fluorescência emitida pela população espermática com membrana plasmática íntegra e marcada com o anticorpo antifosfotirosina conjugado a uma fluoresceína (IFMPIANT) no sêmen eqüino *in natura* e pós-descongelamento. Os valores estão representados em unidades arbitrárias (ua) – Pirassununga - 2009

6.1.6 EFEITO DA CONGELAÇÃO SOBRE A HIPERATIVACÃO ESPERMÁTICA

O sêmen descongelado apresentou uma redução ($p < 0,05$) na porcentagem de células consideradas hiperativadas (células com $VCL \geq 180 \mu\text{m/s}$ e um $ALH \geq 12 \mu\text{m}$) (Gráfico 11).

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

Gráfico 11 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) hiperativadas (HIPER) no sêmen equino *in natura* e pós-descongelamento – Pirassununga - 2009

6.1.7 EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO

A criopreservação levou a redução ($p < 0,05$) nos valores das seguintes características avaliadas pela análise computadorizada do sêmen (CASA); motilidade total (%), motilidade progressiva (%), células rápidas (%) (Gráfico 12), além de reduzir ($p < 0,05$) as velocidades (VAP, VSL e VCL-Gráfico 13) o BCF (Gráfico 14) e a amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, Gráfico 15). Porém a criopreservação levou a um aumento ($p < 0,05$) na retilinearidade (STR, Gráfico 16) e não alterou ($p > 0,05$) a linearidade (LIN, Gráfico 16).

Gráfico 12 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) classificadas com motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e como células rápidas (RAP) no sêmen equino *in natura* e pós-descongelação - Pirassununga - 2009

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

Gráfico 13 - Médias $\pm$ erros padrão das velocidades ($\mu\text{m/s}$) de trajeto (VAP), progressiva (VSL) e curvilínea (VCL) no sêmen equino *in natura* e pós-descongelação - Pirassununga - 2009

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

Gráfico 14 - Médias $\pm$ erros padrão da frequência de batimentos (BCF, Hz) no sêmen eqüino *in natura* e pós-descongelção – Pirassununga - 2009

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

Gráfico 15 - Médias $\pm$ erros padrão da amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozóide (ALH, μm) no sêmen eqüino *in natura* e pós-descongelção – Pirassununga - 2009

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

Gráfico 16 - Médias $\pm$ erros padrão da retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %) no sêmen equino *in natura* e pós-descongelamento – Pirassununga - 2009

6.2 EFEITO DA ADIÇÃO DO PLASMA SEMINAL SOBRE AS MUDANÇAS SEMELHANTES À CAPACITAÇÃO E A PEROXIDAÇÃO DAS MEMBRANAS EM FUNÇÃO DO TEMPO

Neste tópico serão abordados os efeitos da adição dos tratamentos em função do tempo de incubação. Ressalta-se que às variáveis estudadas foram estatisticamente significativas para a interação entre o tempo e o tratamento, desta maneira não se pode estudar os efeitos principais em separado com exceção das variáveis intensidade da fluorescência emitida pela população espermática com membrana plasmática íntegra e ligada ao anticorpo antifosfotirosina conjugado a fluoresceína (IFMPIANT), porcentagem de células capacitadas (CAP) e intensidade da fluorescência emitida pela população espermática com membrana plasmática íntegra e com aumento da peroxidação das membranas (IFPERMI).

6.2.1 EFEITO DA ADIÇÃO DO PLASMA SEMINAL SOBRE A REAÇÃO ACROSSOMAL E A INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO COM OS TRATAMENTOS

Inicialmente (tempo 0) a adição de 20 % de plasma seminal, seja o autólogo ou o homólogo, levou a um aumento ($p < 0,05$) na categoria de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras (Gráfico 17). Fato este que se inverteu nos outros dois tempos de amostragem (60 e 120 minutos; Gráfico 17).

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

Gráfico 17 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) com membranas acrossomal e plasmática íntegras (AIMI) no sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

O plasma seminal homólogo quando adicionado ao sêmen descongelado (tempo 0) diminui ($p < 0,05$; Gráfico 18) a quantidade de células com a membrana plasmática íntegra e o acrossoma reagido (ARMI), já o autólogo não teve o mesmo efeito neste período permanecendo igual ($p > 0,05$) ao grupo DIL. Passados 60 minutos da incubação

nos tratamentos houve um aumento significativo ($p<0,05$) no número de espermatozóides viáveis com o acrossoma reagido nos grupos PA e PH, ambos em relação ao DIL. Já aos 120 minutos de incubação houve um aumento ($p<0,05$) desta categoria de células no grupo DIL em relação ao PH. Neste momento (tempo 120) o grupo PA não apresentou diferença em relação aos outros tratamentos.

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

Gráfico 18 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) com membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida (ARMI) no sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

No tempo 0 a variável células com membrana acrossomal íntegra (MAI), apenas aumentou ($p<0,05$) no grupo PA permanecendo inalterada ($p>0,05$) nos outros dois grupos (DIL e PH; Gráfico 19). Já nas amostras analisadas nos tempo 60 e 120 minutos após incubação não foi possível identificar nenhuma mudança significativa ($p>0,05$; Gráfico 19).

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

Gráfico 19 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células com membrana acrossomal íntegra (MAI) no sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

A adição do plasma (autólogo ou homólogo) exerceu um efeito positivo ($p < 0,05$) na integridade da membrana plasmática (MI) logo após sua adição ao sêmen descongelado (tempo 0; Gráfico 20). Fato este que foi modificado nos tempos 60 e 120 minutos após o início de incubação. Nestes outros dois tempos de amostragem o grupo DIL apresentou uma maior quantidade de células apresentando integridade da membrana plasmática quando comparado ao sêmen descongelado e adicionado de plasma seminal (autólogo e homólogo; Gráfico 20).

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

Gráfico 20 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade (%) de células com membrana plasmática íntegra (MI) no sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

6.2.2 EFEITO DA ADIÇÃO DOS TRATAMENTOS NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

No tempo 0 a adição de plasma seminal (autólogo e homólogo) não alterou ($p > 0,05$) a quantidade de células com potencial de membrana mitocondrial, mas aos 60 e aos 120 minutos foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) desta variável em ambos os grupos adicionados de plasma seminal (Gráfico 21).

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

Gráfico 21 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) com potencial de membrana mitocondrial (CP) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) e com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

6.2.3 CONSEQUÊNCIA DA ADIÇÃO DOS TRATAMENTOS EM FUNÇÃO DO TEMPO SOBRE A PEROXIDAÇÃO DAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS

Esta variável não apresentou interação entre tempo e tratamento ($p > 0,05$), sendo então possível a análise dos efeitos principais. Não houve modificações ($p > 0,05$) na intensidade de fluorescência emitida pelas células viáveis (IFPERMI) independentemente do tratamento adicionado (Gráfico 22). Ao se analisar o efeito de tempo, foi verificado que a intensidade de fluorescência emitida aumentou ($p = 0,02$) ao longo do tempo (Gráfico 22).

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

Gráfico 22 - Médias $\pm$ erros padrão dos valores lineares médios da intensidade de fluorescência emitida pelas células viáveis (IFPERMI; u.a.) do sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

6.2.4 EFEITO DA ADIÇÃO DO PLASMA SEMINAL EM FUNÇÃO DO TEMPO NA MANUTENÇÃO DA ESTABILIDADE (FLUIDEZ) DA MEMBRANA PLASMÁTICA

A adição dos tratamentos não alterou ($p > 0,05$) a estabilidade da membrana plasmática no tempo 0, só levando a uma redução ($p < 0,05$) significativa aos 60 e aos 120 minutos de incubação nos grupos PA e PH, sendo que ambos em comparação ao DIL (Gráfico 23).

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

Gráfico 23 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) não capacitadas (NCAP) no sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

A adição do plasma seminal (autólogo e homólogo) levou a uma redução ($p = 0,02$) no número de células capacitadas (CAP) independentemente do tempo (não houve interação tempo x tratamento- $p > 0,05$) de incubação quando comparado ao grupo DIL (Gráfico 24).

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

Gráfico 24 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) capacitadas (CAP) no sêmen equino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

6.2.5 EFEITO DA ADIÇÃO DO PLASMA SEMINAL EM FUNÇÃO DO TEMPO SOBRE A FOSFORILAÇÃO DOS RESÍDUOS DE TIROSINA PRESENTES NA SUPERFÍCIE DO ESPERMATOZÓIDE

Para esta variável não houve efeito significativo ($p < 0,05$) da interação entre tempo e tratamento, desta maneira foi possível estudar os efeitos principais. Houve uma redução ($p = 0,02$) na intensidade de fluorescência captada nos grupos PA e PH (Gráfico 25), resultado que evidência a redução da quantidade de proteínas fosforiladas presentes na superfície da célula espermática. Esta redução de proteínas fosforiladas ocorreu devido à adição de plasma seminal (20%).

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

Gráfico 25 - Médias $\pm$ erros padrão dos valores lineares médios da intensidade de fluorescência emitida pelas células viáveis (IFPIANT; u.a.) do sêmen eqüino após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

6.2.6 EFEITO DA ADIÇÃO DOS TRATAMENTOS EM FUNÇÃO DO TEMPO SOBRE A POPULAÇÃO DE CÉLULAS HIPERATIVADAS

Após a adição dos tratamentos (tempo 0) houve apenas aumento ($p < 0,05$) na população das células hiperativas no grupo PH, este em relação ao DIL. Permanecendo inalterada a população hiperativa do grupo PA, quando comparada aos outros dois tratamentos (Gráfico 26). Já no tempo 60 minutos os tratamentos não diferiram ($p < 0,05$) entre si. Porém aos 120 minutos ocorreu uma redução significativa desta variável nos grupos PA e PH em relação ao DIL (Gráfico 26).

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

Gráfico 26 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (%) hiperativadas após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) e com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

6.2.7 EFEITO DA ADIÇÃO DOS TRATAMENTOS EM FUNÇÃO DO TEMPO NAS CARACTERÍSTICAS DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO

Após a adição dos tratamentos (tempo 0) a motilidade total não foi alterada ($p > 0,05$) em nenhum dos grupos (Gráfico 27). Entretanto, após 60 minutos de incubação os valores da motilidade total foram reduzidos ($p < 0,05$) em ambos os grupos adicionados com plasma seminal (autólogo e homólogo) quando comparado ao grupo DIL. Este resultado permaneceu após os 120 minutos de incubação (Gráfico 27).

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

Gráfico 27 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células com motilidade total (MT, %) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

A motilidade progressiva teve seu valor reduzido ($p < 0,05$) no grupo adicionado de plasma seminal homólogo (PH) logo após a adição dos tratamentos (tempo 0), esta redução foi apenas em relação ao grupo DIL (Gráfico 28). Já aos 60 e 120 minutos de incubação a motilidade progressiva foi inferior ($p < 0,05$) em ambos os grupos adicionados de plasma que possuíam valores similares ($p > 0,05$) entre si (Gráfico 28).

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

Gráfico 28 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células com motilidade progressiva MP, %) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

No tempo 0, a porcentagem de células rápidas não foi influenciada ($p > 0,05$) pela adição dos tratamentos (Gráfico 29). Fato este, alterado aos 60 minutos no qual os grupos adicionados de plasma seminal (PA e PH) tiveram a quantidade de células rápidas reduzidas em relação ao DIL. Contudo aos 120 minutos os valores da quantidade das células rápidas diferiram entre os três grupos (DIL > PA > PH, $p < 0,05$; Gráfico 29).

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

Gráfico 29 - Médias $\pm$ erros padrão da quantidade de células (CR, %) rápidas após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

A velocidade de trajeto (VAP) não teve seus valores diferidos ($p > 0,05$) entre os tratamentos no tempo 0 (Gráfico 30). Porém seus valores foram reduzidos ($p < 0,05$), no tempo 60 minutos, tanto no grupo PA quanto para o PH. Os valores da VAP para os grupos PA e PH permaneceram reduzidos no tempo 120 minutos, quando comparados aos valores obtidos no DIL (Gráfico 30).

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

Gráfico 30 - Médias $\pm$ erros padrão da variável velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

A distribuição do sêmen nos tratamentos (tempo 0) não provocou diferenças ($p > 0,05$) entre as velocidades progressivas (VSL; Gráfico 31). Entretanto aos 60 minutos houve uma redução na VSL para os grupos PA e PH que permaneceram inferiores ao DIL, também, aos 120 minutos (Gráfico 31).

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

Gráfico 31 - Médias $\pm$ erros padrão da velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

A adição de plasma seminal (autólogo e homólogo) não reduziu ($p > 0,05$) os valores da velocidade curvilínea (VCL) no tempo 0 (Gráfico 32), mas aos 60 e 120 minutos observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) nos grupos PA e PH ao se comparar com o grupo DIL (Gráfico 32).

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

Gráfico 32 - Médias $\pm$ erros padrão da velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

O plasma seminal (autólogo e homólogo) levou a redução ($p < 0,05$) da frequência de batimentos (BCF) nos tempos 0, 60 e 120 minutos quando comparado ao grupo DIL (Gráfico 33).

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

Gráfico 33 - Médias $\pm$ erros padrão da frequência de batimentos (BCF, Hz) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

A adição do plasma autólogo levou a um aumento ($p > 0,05$) na amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) em relação ao DIL, isto ocorreu no tempo 0 (Gráfico 34). Entretanto aos 60 e aos 120 minutos os valores de ALH foram inferiores ($p < 0,05$) nos grupos adicionados de 20 % de plasma seminal (Gráfico 34).

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

Gráfico 34 - Médias $\pm$ erros padrão da amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

A retilinearidade (STR) foi inicialmente (tempo 0) menor ($p < 0,05$) nos grupos adicionados com plasma seminal (Gráfico 35). Contudo ao passar o tempo (tempo 60 e 120 minutos) os valores de STR só foram inferiores ($p < 0,05$) no grupo tratado com plasma autólogo (Gráfico 35).

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

Gráfico 35 - Médias $\pm$ erros padrão da retilinearidade (STR, %) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

Logo após a adição dos tratamentos (tempo 0), houve uma redução ($p < 0,05$) nos valores de linearidade nos grupos adicionados de plasma seminal (PA e PH; Gráfico 36). Porém nos tempos de amostragem subsequentes (60 e 120 minutos) este valor só foi menor no grupo que estava tratado com plasma seminal autólogo (Gráfico 36).

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

Gráfico 36 - Médias $\pm$ erros padrão da linearidade (LIN, %) após a adição de diluidor para criopreservação sem crioprotetor (DIL), deste com 20 % de plasma seminal autólogo (v/v) (PA) ou com 20 % de plasma seminal homólogo (v/v) (PH), nos diferentes tempos de amostragem (0, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C) – Pirassununga - 2009

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

A capacitação é um evento seqüencial que envolve numerosas mudanças fisiológicas no espermatozóide como a mudança na fluidez das membranas (HARRISON et al., 1996), mudança no padrão da motilidade (SUAREZ; KATZ; OVERSTREET, 1983), aumento das sinalizações intracelulares (VISCONTI et al., 2002) e culmina com a reação acrossomal após a ligação do espermatozóide a zona pelúcida (GADELLA et al., 2001). O acompanhamento destes eventos permitiu verificar se o processo de criopreservação leva a mudanças que possam realmente ser consideradas como similares as que ocorrem durante a capacitação do espermatozóide eqüino.

Com as técnicas de análise realizadas no presente experimento foi possível verificar que o sêmen *in natura* apresenta uma população heterogênea (WATSON, 1995; SCHEMBRI et al., 2002), constituída de espermatozóides não viáveis (positivo para IP ou Yo-pro-1), viáveis não capacitados (negativo para Yo-pro-1 e negativo para Merocianina 540) e capacitados (negativo para Yo-pro-1 e positivo para Merocianina 540), hiperativados, além de células que apesar de serem viáveis possuem o acrossoma reagido (negativo para IP e positivo para FITC-PSA), fato que as torna potencialmente inférteis já que estas não seriam nem capazes de realizar a ligação a zona pelúcida, muito menos ultrapassar esta barreira glicoprotéica que circunda o oócito.

As células viáveis, identificadas no sêmen *in natura* como capacitadas, podem ser consideradas as responsáveis por fertilizar o oócito de éguas que recebem a cobertura ou a inseminação artificial em períodos próximos ou até mesmo pós-ovulatório. Acreditamos que estes espermatozóides não precisariam permanecer por um determinado período de tempo no trato reprodutivo feminino, para então se tornarem aptos a fertilizar o oócito.

Percebe-se através dos resultados obtidos que o processo de criopreservação lesa em maior intensidade as categorias de células que estão capacitadas, hiperativadas ou com o acrossoma reagido, mostrando deste modo que a criopreservação tem um efeito seletivo. A criopreservação seleciona certas populações, levando deste modo, o sêmen descongelado a possuir uma população mais homogenia (WATSON, 1995; OLLERO; CEBRIAN-PEREZ; MUIÑO-BLANCO, 1997).

A criopreservação do sêmen não levou a um aumento no número de células viáveis seja com o acrossoma reagido, capacitadas ou hiperativadas. Estes resultados contrariam diversos trabalhos que relacionam a criopreservação com as mudanças que se assemelham a capacitação (FULLER; WHITTINGHAM, 1996; PÉRES et al., 1996; CORMIER; SIRARD, BAILEY, 1997; GILLAN; EVANS; MAXWELL, 1997; MAXWELL; JOHNSON, 1997; SCHEMBRI et al., 2002; NEILD et al., 2003; BALL, 2008), porém deve-se ressaltar que alguns destes trabalhos foram realizados com a técnica da clortetraciclina (CTC) como meio de acompanhar e identificar a capacitação. Trabalhos mais recentes tiveram como resultados que a refrigeração do sêmen a 5°C (GREEN; WATSON, 2001; BRAVO et al., 2005) ou após a criopreservação (THOMAS; MEYER; BALL, 2006) não aumentam o número de células viáveis (negativo para Yo-pro-1) capacitadas (positivas para a Merocianina 540). Estes autores também descrevem que o padrão de fosforilação dos resíduos de tirosina das proteínas dos espermatozóides capacitados diverge do encontrado no sêmen submetido à refrigeração ou a criopreservação.

Nos experimentos que descrevem a ocorrência da criocapacitação, a população de células encontradas com o padrão B, quando coradas com CTC, consideradas então capacitadas, provavelmente são originadas do aumento intracelular da concentração de íons Ca^{2+} durante a refrigeração a 5°C. Conforme a temperatura da célula espermática vai diminuindo ocorre a inibição de certas enzimas, como por exemplo, a inibição da enzima Ca^{2+} ATPase, esta enzima é responsável por manter os baixos níveis de Ca^{2+} no interior do espermatozóide. Ressalta-se que estes valores encontrados no interior destas células tornam-se superiores aos encontrados em células tratadas com cálcio ionóforo (FULLER; WHITTINGHAM, 1996; GREEN; WATSON, 2001).

Embora um aumento da fluidez das membranas não tenha sido detectado após a descongelação das amostras, isto não significa necessariamente que não houve nenhuma alteração na membrana plasmática (GREEN; WATSON, 2001). A fase crítica, na qual está descrita o “choque frio” ocorre por volta de 15-5°C (DROBNIS et al., 1993; WATSON, 2000) sendo que neste experimento não foram feitas avaliações durante este período.

Entretanto, os espermatozóides pós-descongelação apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) quanto à presença de proteínas fosforiladas na superfície da célula espermática, ao contrário do que imaginávamos, este aumento não foi acompanhado pela quantidade de células classificadas como capacitadas pela análise da associação das sondas Yo-pro-1 e Merocianina 540 (FLESCH et al., 1999). Deve ser lembrado que o

aparecimento de proteínas com resíduos de tirosina fosforilado na superfície da célula espermática ocorre por causa de um aumento da fluidez da membrana (capacitação). O aumento de fluidez da membrana plasmática é acompanhado pela fosforilação destas proteínas que até então se encontravam no interior da célula e que devido a estas fosforilações passam por mudanças de conformação e função. As mudanças que ocorrem nestas proteínas permitem que estas sejam expostas na superfície da membrana plasmática para então realizarem seu papel, no que supostamente está relacionado com a ligação entre o espermatozóide e a zona pelúcida (ASQUITH et al., 2004). Em nosso experimento supõe-se que este aumento das proteínas fosforiladas na superfície da célula tenha ocorrido em etapas que compõem a criopreservação e gera mudanças momentâneas do estado de fluidez da membrana plasmática (ex. durante a refrigeração de 15-5°C), fato este que leva a um aumento nas concentrações do íon Ca^{2+} no interior da célula, que então é o suficiente para iniciar a fosforilação de certas proteínas pela via de ativação da adenilato ciclase (VISCONTI et al., 1999).

Outro conhecido mecanismo que leva a fosforilação dos resíduos de tirosina é a presença de espécies reativas de oxigênio (AITKEN et al., 1998; LEWIS; AITKEN, 2001; BAUMBER et al., 2003; AITKEN et al., 2004). A criopreservação levou a um aumento significativo na peroxidação das membranas espermáticas, ou seja, este mecanismo soma-se aos outros dois já citados no parágrafo acima como responsáveis pelo aparecimento das proteínas fosforiladas na superfície do espermatozóide.

Salienta-se que após a criopreservação observou-se um aumento no número de células com a membrana plasmática lesada. As células lesadas liberam o seu pequeno, mas existente conteúdo, podendo alterar o meio em que as células se encontram, desta maneira suprimindo os fatores necessários para que ocorra a capacitação (VADNAIS; ROBERTS, 2007). Dentre estes fatores estimuladores da capacitação encontram-se as espécies reativas de oxigênio (AITKEN et al., 1995; AITKEN et al., 1998; BALL, 2008).

As EROs geradas no processo de criopreservação podem ter como origem as mitocôndrias, estas são freqüentemente identificadas como estruturas danificadas após o processo de congelamento/descongelamento (BALL, 2008). As amostras pós-descongelamento tiveram uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, o que demonstra que a sua função foi alterada pela criopreservação. As mitocôndrias quando lesadas são incapazes de realizar o metabolismo oxidativo de forma correta, levando a geração de EROs (BALL, 2008).

Os resultados obtidos levam-nos a acreditar que a técnica de criopreservação tem em suas etapas fases nas quais os espermatozóides adquirem características que são inerentes a capacitação e a reação acrossômica (presença de proteínas fosforiladas na superfície da célula) (ASQUITH et al., 2004; ANDRADE et al., 2008), mas estes estímulos parecem ocorrer de maneira precoce e desordenadamente. Esta criocapacitação observada no espermatozóide eqüino pós-descongelamento pode explicar, em parte, a menor sobrevivência destas células no trato reprodutivo feminino.

A adição do plasma seminal homólogo (oriundo de um garanhão com boa qualidade seminal e fertilidade comprovada com o uso de sêmen congelado) pós-descongelamento não melhorou a qualidade do sêmen quando comparado ao plasma autólogo em nenhuma das características avaliadas, ou seja, diferentemente do que ocorre quando este plasma seminal é adicionado antes da congelamento e leva a melhoras na integridade da membrana plasmática e da motilidade (AURICH et al., 1996; HERNÁNDEZ et al., 2007).

Vadnais et al. (2005) conseguiram uma maior reversão da criocapacitação quando adicionado 20 % de plasma seminal ao sêmen descongelado, descrevendo que um ou mais componentes do plasma seminal tem a habilidade de inibir a capacitação. Porém nestes trabalhos os resultados foram obtidos na espécie suína. Na espécie eqüina Andrade et al. (2006) e Arruda et al. (2008) obtiveram os melhores resultados na reversão da criocapacitação com a adição de 25 % de plasma seminal. Entretanto, nestes trabalhos não se encontra descrita a equação de segundo grau gerada na análise estatística dos dados. Esta equação permitiu a obtenção do valor ideal a ser adicionado que foi de 22,29 % (ANDRADE et al., 2007). Destaca-se que o plasma seminal quando adicionado em valores superiores a 25 % (v/v) prejudica a motilidade espermática (ARRUDA et al., 2008).

O efeito inibitório da capacitação contido no plasma seminal deve ser resultado de proteínas que se ligam a superfície e previnem as mudanças na membrana necessária para a capacitação e/ou inibem os sinais de transdução de capacitação para outros pontos (VADNAIS; ROBERTS, 2007), tendo em vista, que a adição do plasma seminal foi capaz de diminuir a quantidade de proteínas fosforiladas na superfície da membrana plasmática, além de diminuir a porcentagem de células capacitadas e melhorar a integridade da membrana plasmática.

Os resultados obtidos poderiam ser mais representativos caso não houvéssimos usado um diluidor a base de gema de ovo, já que os constituintes da gema do ovo obstruem a ligação à membrana plasmática dos constituintes do plasma seminal responsáveis pela reversão da criocapacitação (VADNAIS et al., 2005).

Nota-se que a adição do plasma seminal apesar de inicialmente ter demonstrado efeitos positivos, quanto à diminuição de proteínas da superfície do espermatozóide fosforiladas, redução da quantidade de espermatozóides criocapacitados e melhora na integridade da membrana plasmática, foi deletério para a maioria das características das células analisadas a partir da segunda amostragem que ocorreu após 60 minutos da adição dos tratamentos, este fato coincidindo com o que foi citado por Moore, Squires e Graham (2005) que observaram queda na motilidade, após 90 minutos da descongelação, das amostras com 20 % de plasma seminal.

O plasma seminal de garanhões contém em sua constituição substâncias que não são as ideais para a manutenção da célula em armazenamento (KARESKOSKI; KATILA, 2008). Uma das substâncias que é descrita como deletéria para a manutenção da motilidade é NaCl (NISHIKAWA, 1975), este se encontra presente, principalmente, no primeiro jato do ejaculado (KARESKOSKI et al., 2005). Deste modo, para a obtenção do plasma seminal a ser adicionado pós-descongelação, o fracionamento do sêmen com o descarte da primeira fração poderia levar-nos a obter melhores resultados do que os encontrados já que neste trabalho foram utilizados plasmas seminais obtidos de ejaculados totais.

O plasma seminal apesar de conter os mecanismos antioxidantes que evitam os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio (POTTS; NOTARIANNI; JEFFERIES, 2000; MARQUES et al., 2002) não foi capaz de reduzir a peroxidação das membranas dos espermatozóides. Os espermatozóides de uma forma geral (tratamentos DIL, PA e PH) tiveram a peroxidação de suas membranas aumentadas durante o período de incubação. Este resultado faz-nos supor que durante a incubação (37°C) vai ocorrendo a depleção dos mecanismos antioxidantes presentes na membrana plasmática dos espermatozóides e que os mecanismos antioxidantes (LI, 1975; SANOCKA et al., 1996; ALKAN et al., 1997; LEWIS et al., 1997; OCHSENDORF et al., 1998; YEUNG et al., 1998) contidos no plasma seminal não atuam diretamente no combate a peroxidação que ocorre na membrana plasmática.

Salienta-se que observações clínicas indicam que éguas inseminadas com sêmen descongelado desenvolvem uma distinta e prolongada endometrite pós-inseminação (TROEDSSON et al., 2001). Alguns autores vêm demonstrando através de seus trabalhos que o plasma seminal causa um efeito imunossupressor, diminuindo o número de neutrófilos, bem como a proporção de espermatozóides fagocitados (FIALA et al., 2002; ALGHAMDI; FOSTER; TROEDSSON, 2004; ALGHAMDI et al., no prelo¹). Neste contexto, considera-se que a retirada do plasma seminal para a criopreservação do sêmen é uma das causas da redução da fertilidade. Deste modo, pondera-se que a adição do plasma seminal no sêmen pós-descongelamento, antes da inseminação, pode aumentar a fertilidade do sêmen de garanhões (MOORE; SQUIRES; GRAHAM, 2005).

Diante dos resultados obtidos e da literatura consultada podemos considerar que a adição do plasma seminal após a descongelamento do sêmen há de ser considerada como uma ferramenta para melhorar os índices de fertilidade com o sêmen congelado na espécie equina. Além de reduzir os efeitos da criocapacitação e melhorar a integridade da membrana plasmática, sabe-se por trabalhos realizados recentemente, que o plasma seminal exerce um efeito imunomodulador que deve ser aproveitado principalmente quando há a necessidade de se realizar inseminações em períodos inferiores a 48 horas, como por vezes acontece em inseminações com sêmen refrigerado e criopreservado.

¹ ALGHAMDI, A. S.; LOVAAS, B. J.; BIRD, S. L.; LAMB, G. C.; RENDAHL, A. K.; TAUBE, P. C.; FOSTER, D. N. Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding. *Animal Reproduction Science*, *in press*, 2008.

8 CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

1. O processo de criopreservação do sêmen eqüino provoca na célula espermática mudanças semelhantes às ocorridas no evento da capacitação (criocapacitação) e aumento na produção das espécies reativas de oxigênio.
2. O processo de criopreservação do sêmen eqüino não provoca na célula espermática mudanças no padrão da motilidade que se assemelham a hiperativação.
3. A adição de plasma seminal ao sêmen descongelado reduz os efeitos da criocapacitação, mas não a geração de espécies reativas de oxigênio.
4. O plasma seminal oriundo de garanhões com boa congelabilidade e fertilidade não tem maior capacidade de reduzir os efeitos da criocapacitação e a produção de espécies reativas de oxigênio.
5. A manutenção da viabilidade espermática é prejudicada pela adição de plasma seminal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABAD, M.; SPRECHER, D. J.; ROSS, P.; FRIENDSHIP, R. M.; KIRKWOOD, R. N. Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 149-152, 2007.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 459-469, 1987.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 183-197, 1989.
- AITKEN, R. J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioassays**, v. 16, p. 259-267, 1994.
- AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; KNOX, W.; PATTERSON, M.; IRVINE, D. S. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterized by a redox-regulated cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. **Journal Cell Science**, v. 111, p. 645-656, 1998.
- AITKEN, R. J.; PATTERSON, M.; FISHER, H.; BUCKINGHAM, D. W.; VAN DUIN, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal Cell Science**, v. 108, p. 2017-2025, 1995.
- AITKEN, R. J.; RYAN, A. L.; BAKER, M. A.; MCLAUGHLIN, E. A. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 8, p. 994-1010, 2004.
- ALGHAMDI, A. S.; FOSTER, D. N.; TROEDSSON, M. H. T. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. **Reproduction**, v. 127, p. 593-600, 2004.
- ALGHAMDI, A. S.; LOVAAS, B. J.; BIRD, S. L.; LAMB, G. C.; RENDAHL, A. K.; TAUBE, P. C.; FOSTER, D. N. Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding. *Animal Reproduction Science*, *in press*, 2008.
doi:10.1016/j.anireprosci.2008.10.015. Disponível em: www.sciencedirect.com/science. Acesso em: 17 jan. 2009.
- ALKAN, I.; SIMSEK, F.; HAKLAR, G.; KERVANCIOGLU, E.; OZVERI, H.; YALCIN, S.; AKDAS, A. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. **Journal of Urology**, v. 157, p. 140-143, 1997.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Gamete Research**, v. 23, p. 77-90, 1989.

ANDERSON, R. G.; JACOBSON, K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. **Science**, v. 296, p. 1821-1825, 2002.

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

ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; MARTINS, S. M. M. K.; PERES, K. R.; BIANCONI, L. L.; ARRUDA, R. P. Seminal plasma reduce acrosome reaction in post-thawed equine spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 266, 2006.

ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; PERES, K. R.; MARTINS, S. M. M. K.; BIANCONI, L. L.; ARRUDA, R. P. Integridade das membranas plasmática e acrossomal avaliadas por citometria de fluxo: Qual é o efeito da adição de plasma seminal sobre estas características? **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 951, 2007.

ANDRADE, A. F. C.; ZAFFALON, F. G.; MERIGHE, G. K. F.; NASCIMENTO, J.; TARRAGÓ, O. F. B.; MEIRELLES, F. V.; ARRUDA, R. P. Relation between tyrosine phosphorylation of the equine sperm surface proteins and acrosome reaction. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 304-305, 2008.

ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; PERES, K. R.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M. M. K.; BIANCONI, L. L. Effects of addition of seminal plasma on lifespan of frozen thawed equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 307-308, 2008.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121 p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2000.

ASQUITH, K. L.; BALEATO, R. M.; MCLAUGHLIN, E. A.; NIXON, B.; AITKEN, R. J. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 3645-3657, 2004.

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

AURICH, J. E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal Plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, p. 791-797, 1996.

AUSTIN, C. R. The 'Capacitation' of the Mammalian sperm. **Nature**, v. 170, p. 326, 1952.

- BADER, H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, p. 59-64, 1982. Supplement.
- BAILEY, J.; BILOUDEAU, J.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 1-7, 2000.
- BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 257-267, 2008.
- BALL, B. A.; VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C₁₁- BODIPY^{581/591}. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 2, p. 259-269, 2002.
- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGU, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1531-1537, 2000.
- BAUMBER, J.; SABELUR, K.; VO, A.; BALL, B. A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 60, p. 1239-1247, 2003.
- BAVISTER, B. D.; LEIBFRIED, M. L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in defined culture medium. **Biology of Reproduction**, v.28, p. 235-247, 1983.
- BAZER, F. W.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T. Fertilização, clivagem e implantação. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 1995. Cap. 7, p. 191-216..
- BOQUET, M.; SPIRITO, S.; GIULIANO, S.; NEILD, D. M.; CHAVES, M. G.; AGÜERO, A.; PAZ, D.; FERRARI, M. Efectos de la criopreservación sobre la cromatina de espermatozoides equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 297-298, 1999.
- BRAVO, M. M.; APARICIO, I. M.; GARCIA-HERREROS, M.; GIL, M. C.; PEÑA, F. J.; GARCIA-MARIN, L. J. Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 88-96, 2005.
- BROMLEY, S. K.; IABONI, A.; DAVIS, S. J.; WHITTY, A.; GREEN, J. M.; SHAW, A. S.; WEISS, A.; DUSTIN, M. L. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. **Nature Immunology**, v. 2, p. 1159-1166, 2001.
- BROUWERS, J. F.; GADELLA, B. M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 1382-1391, 2003.
- BURKMAN, L. J. Discrimination between nonhyperactivated and classical hyperactivated motility patterns in human spermatozoa using computerized analysis. **Fertility and Sterility**, v. 55, p. 363-371, 1991.

- BURKS, D. J.; CARBALLADA, R.; MOORE, H. D. M.; SALING, P. M. Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. **Science**, v. 269, p. 83-86, 1995.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrossomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 119-131, 2008.
- CHANG, M. C. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. **Nature**, v. 168, p. 697-698, 1951.
- CHOI, Y. H.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; SEIDEL JR., G. E.; SQUIRES, E. L. Effect of capacitation of stallion sperm with polyvinylalcohol or bovine serum albumin on penetration of bovine zona-free or partially zona-removed equine oocytes. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2080-2087, 2003.
- COLENBRANDER, B.; BROUWERS, J. F. H. M.; NEILD, D. M.; STOUT, T. A. E.; DA SILVA, P.; GADELLA, B. M. Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. **Theriogenology**, v. 58, p. 341-345, 2002.
- COLENBRANDER, B.; RATHI, R.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M. Capacitation related changes in stallion spermatozoa. In: Proceedings of a workshop entitled From Epididymis to embryo. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, n. 6, p. 24, 2001.
- CORMIER, N.; BAILEY, J. L. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation- induced capacitation of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 177-185, 2003.
- CORMIER, N.; SIRARD, M. A.; BAILEY, J. L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 461-468, 1997.
- COTTORELLO, A. C. P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação e avaliação do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 1, p. 14-25, 2002.
- CROSS, N. L. Multiple effects of seminal plasma on the acrossome reaction of human sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, p. 316-323, 1993.
- CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 7-11, 1998.
- DE BLAS, G. A.; ROGGERO, C. M.; TOMES, C. N.; MAYORGA, L. S. Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrossomal exocytosis. **PLoS Biology**, v. 10, e323, 2005. Disponível em: < http://biology.plosjournals.org/archive/1545-7885/3/10/pdf/10.1371_journal.pbio.0030323-S.pdf >. Acesso em: 13 jan. 2009.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

DE LAMIRANDE, E.; O'FLAHERTY, C. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 106-115, 2008.

DE LEEUW, F. E.; CHEN, H. C.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v. 27, p. 171-183, 1990.

DEMOTT, R. P.; SUAREZ, S. S. Hyperactivated sperm progression in the mouse oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 779-785, 1992.

DROBNIS, E. Z.; CROWE, L. M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T. J.; OVERSTREET, J. W.; CROWE, J. H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **Journal of Experimental Zoology**, v. 265, p. 432-437, 1993.

DUNKAN, A. E.; FRASER, L. R. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of epididymal mouse sperm proteins during capacitation in vitro: identification of an *M*_r 95000 phosphotyrosine-containing protein. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 287-299, 1993.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p. 29-77.

EMILIOZZI, C.; FENICHEL, P. Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm in vitro but is not sufficient for its completion. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 674-679, 1997.

FIALA, S. M.; PIMENTEL, C. A.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology**, v. 67, p. 556-562, 2007.

FIALA, S. M.; PIMENTEL, C. A.; STEIGER, K.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of skim milk and seminal uterine infusions in mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 491-494, 2002.

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

FRASER, L. R.; MCDERMOTT, C. A. Ca²⁺-related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca²⁺-ATPase. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 96, p. 363-377, 1992.

FRASER, L. R.; MONKS, N. J. Cyclic nucleotides and mammalian sperm capacitation. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 42, p. 9-21, 1990. **Suplemento**.

FULLER, S. J.; WHITTINGHAM, D. G. Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 139-145, 1996.

GADELLA, B. M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 229-236, 2008.

GADELLA, B. M.; HARRISON, R. A. P. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. **Development**, v. 127, p. 2407-2420, 2000.

GADELLA, B. M.; MILLER, N. G. A.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLD, HARRISON, R. A. P. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p. 108-125, 1999.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BEVERS, M. M.; BROUWERS, J. F. H. M.; NEILD, D.; COLENBRANDER, B. The role of lipid dynamics in equine sperm plasma membrane function. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, n. 5, p. 24, 2001.

GADELLA, B. M.; TSAI, P.; BOERKE, A.; BREWIS, I. A. Sperm head membrane reorganization during capacitation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, p. 473-480, 2008.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóide e plasma seminal. In: Hafez, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. Ed. Barueri: Manole Ltda, 2004. Cap.7, p. 97-110.

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

GOMEZ, E.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International Journal of Andrology**, v. 21, p. 81-94, 1998.

GRASA, P.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Signal transduction mechanisms involved in *in vitro* ram sperm capacitation. **Reproduction**, v. 132, p. 721-732, 2006.

GREEN, C. E.; WATSON, P. F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v. 122, p. 889-898, 2001.

GUTHRIE, H. D.; MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. The effect of seminal plasma and dilution rate on the motility and viability of frozen-thawed boar sperm. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000, Estocolmo, Suécia. **Abstracts...** 2000. p. 143.

HAN, H. L.; MACK, S. R.; DE JONGE, C.; ZANEFELD, L. J. D. Inhibition of the human sperm acrosome reaction by a high molecular weight factor from human seminal plasma. **Fertility and Sterility**, v. 54, p. 1177-1179, 1990.

HARRISON, R. A. P.; ASHWORTH, P. J. C.; MILLER, N. G. A. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 378-391, 1996.

HERNÁNDEZ, M.; ROCA, J.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ; VÁSQUES, J. M.; MARTÍNEZ, E. A. Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezers. **Journal of Andrology**, v. 28, p. 689-697, 2007.

HO, H.; SUAREZ, S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v. 122, p. 519-526, 2001.

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p. 447-457, 1986.

HOWES, E.; PASCALL, J. C.; ENGEL, W.; JONES, R. Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 4127-4136, 2001.

HUNTER, R. H. F. Capacitation of mammalian spermatozoa: a physiological perspective set against presumptive maturation *in vitro*. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, n. 6, p. 21-23, 2001.

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

JONES, R.; SHALGI, R.; HOYLAND, J.; PHILLIPS, D. M. Topographical rearrangement of a plasma membrane antigen during capacitation of rat spermatozoa *in vitro*. **Development Biology**, v. 139, p. 349-362, 1990.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 249-256, 2008.

KARESKOSKI, M.; REILAS, T.; SANKARI, S.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Composition of fractionated stallion ejaculates. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 228-230, 2005.

KATILA, T. Sperm-uterine interactions: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 267-272, 2001.

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; ALVARENGA, M. A.; SEIDEL JR., G. E.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Penetration of zona-free hamster, bovine and equine oocytes by stallion and bull spermatozoa pretreated with equine follicular fluid, dilauroylphosphatidylcholine or calcium ionophore A23187. **Theriogenology**, v. 56, p. 937-953, 2001.

LEWIS, B.; AITKEN, R. J. A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 611-622, 2001.

- LEWIS, S. E. M.; STERLING, E. S. L.; YOUNG, I. S.; THOMPSON, W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 67, p. 142-147, 1997.
- LI, T. K. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 12, p. 641-646, 1975.
- MARQUES, A.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GOBESSO, A. A. O.; NEVES NETO, J. R. Effects of ascorbic acid and pentoxifyline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.
- MARQUEZ, B.; SUAREZ, S. S. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1626-1633, 2004.
- MAXWELL, W. M.; JOHNSON, L. A. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 408-418, 1997.
- MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G.; MORTIMER, S. T.; GILLAN, L.; GELLATLY, E. S.; MCPHIE, C. A. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. **Reproduction Fertility and Development**, v. 11, p. 123-126, 1999.
- MINELLI, A.; MORONI, M.; MARTINEZ, E.; MEZZASOMA, I.; RONQUIST, G. Occurrence of prostasome-like membrane vesicles in equine seminal plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, p. 237-243, 1998.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, p. 2372-2381, 2005.
- MOORE, H. D. M.; HALL, G. A.; HIBBIT, K. G. Seminal Plasma proteins and the reaction of spermatozoa from intact boars and from boars without seminal vesicles to cooling. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 39-45, 1976.
- MORRIS, L. H. A.; HUNTER, R. H. F.; ALLEN, W. R. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa, at the uterotubal junction of preovulatory mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, p. 95-100, 2000.
- NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ALONSO, M. A.; CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 351-358, 2008.
- NAZ, R. K.; RAJESH, P. B. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, 2004. Disponível em: <<http://www.rbej.com/content/2/1/75>>. Acesso em: 12 jan. 2009.
- NEILD, D. M.; GADELLA, B. M.; CHAVES, M. G.; MIRAGAYA, M. H.; COLENBRANDER, B.; AGÜERO, A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 59, p. 1693-1705, 2003.

- NEVES NETO, J. R. **Avaliação morfo-funcional e fertilidade de sêmen congelado eqüino utilizando diferentes diluentes e substâncias crioprotetoras**. 2004. 102 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.
- NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. 2003. 101 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- NISHIKAWA, Y. Studies on the preservation of raw and frozen horse semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 99-104, 1975. **Supplement**.
- OCHSENDORF, F. R.; BUHL, R.; BASTLEIN, A.; BESCHMANN, H. Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. **Human Reproduction**, v. 13, p. 353-359, 1998.
- OLIVEIRA, G. M. **Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e teste hiposmótico como métodos auxiliares ao exame de motilidade retilínea e progressiva para avaliação de sêmen de touros Nelore PO, antes do congelamento**. 2003. 46 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- OLLERO, M.; CEBRIAN-PEREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Improvement of cryopreserved ram heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 732-739.
- PAP, E. H. W.; DRUMMEN, G. C. C.; WINTER, V. J.; KOOIJ, T. W. A.; RIJKEN, P.; WIRTZ, K. W. A.; OP DEN KAMP, A. A. F.; HAGE W. J.; POST, J. A. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cell using C11-BODIPY^{581/591}. **FEBS Letter**, v. 453, p. 278-282, 1999.
- PAPA, F. O.; MELO, C. M.; FIORATTI, E. G.; DELL'AQUA JR, J. A.; ZAHN, F. S.; ALVARENGA, M. A. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 293-301, 2008.
- PÉREZ, L. J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; MOSES, D.; BALDASSARRE, H. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v. 46, p. 131-140, 1996.
- PIEHLER, E.; PETRUNKINA, A. M.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; TÖPFER-PETERSEN, P. Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation. **Cytometry Part A**, v. 69A, p. 1062-1070, 2006.
- POMMER, A.C.; MEYERS, S. A. Tyrosine phosphorylation is an indicator of capacitation status in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, p. 351-354, 2002.
- POTTS, R. J.; NOTARIANNI, L. J.; JEFFERIES, T. M. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. **Mutation Research**, v. 447, p. 249-256, 2000.

- RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; ARRUDA, R. P. Effects of centrifugation on membrane integrity and lipid peroxidation of equine cooled spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 344-345, 2008.
- RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 462-470, 2001.
- SANOCKA, D.; MIESEL, R.; JEDRZEJCZAK, P.; KURPISZ, M. K. Oxidative stress and male infertility. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 449-454, 1996.
- SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS user's guide:** statistical analysis system. Release 6.12, Cary, NC: SAS Institute, 1998.
- SCHEMBRI, M. A.; MAJOR, D. A.; SUTTIE, J. J.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 14, p. 225-233, 2002.
- SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, p. 720-731, 1972.
- SØRENSEN, B. SNARE complexes prepare for membrane fusion. **Trends Neurosciences**, v. 28, p. 453-455, 2005.
- SOSTARIC, E.; AALBERTS, M.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A. E. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 237-248, 2008.
- SUAREZ, S. S.; KATZ, D. F.; OVERSTREET, J. W. Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 1277-1287, 1983.
- SUAREZ, S. S.; PACEY, A. A. Sperm transport in the female reproductive tract. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 1, p. 23-37, 2006.
- TARDIF, S.; DUBÉ, C.; CHEVALIER, S.; BAILEY, J. L. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 784-792, 2001.
- THOMAS, A. D.; MEYERS, S. A.; BALL, B. A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, p. 1531-1550, 2006.
- TROEDSSON, M. H. T.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A. S.; DAHMS, B.; DOW, C. A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P. T.; MACPHERSON, M. L.; POZOR, M.; BUHI, W. C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 171-186, 2005.
- TROEDSSON, M. H.; LOSET, K.; ALGHAMDI, A. M.; DAHMS, B.; CRABO, B. G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 273-278, 2001.

- URNER, F.; SAKKAS, D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 125, p. 17-26, 2003.
- VADNAIS, M. L.; KIRKWOOD, R. N.; SPECHER, D. J.; CHOU, K. Effect of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. **Animal Reproduction Science**, v. 90, p. 347-354, 2005.
- VADNAIS, M. L.; ROBERTS, P. K. Effects of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm. **Journal of Andrology**, v. 28, p. 416-422, 2007.
- VAN GESTEL, R. A.; BREWIS, I. A.; ASHTON, P. R.; BROUWERS, J. J.; GADELLA, B. M. Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, p. 445-454, 2007.
- VARNER, D. D.; WARD, C. R.; STOREY, B. T.; KENNEY, R. M. Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 9, p. 1383-1389, 1987.
- VEREB, G.; SZÖLLÖSI, J.; MATKÓ, J.; NAGY, P.; FARKAS, T.; VIGH, L.; MÁTYUS, L.; WALDMANN, T. A.; DAMJANOVICH, S. Dynamic, yet structured: the cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. **PNAS**, v. 100, p. 8053-8058, 2003.
- VILLEGAS, J.; KEHR, K.; SOTO, L.; HENKEL, R.; MISKA, W.; SÁNCHEZ, R. Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. **Andrologia**, v. 35, p. 227-232, 2003.
- VISCONTI, P. E.; NING, X.; FORNES, M. W.; ALVAREZ, J. G.; STEIN, P.; CONNORS, S. A.; KOPF, G. S. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. **Developmental Biology**, v. 214, p. 429-443, 1999.
- VISCONTI, P. E.; WESTBROOK, V. A.; CHERTIHIN, O.; DEMARCO, I.; SLEIGHT, S.; DIEKMAN, A. B. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 133-150, 2002.
- VISCONTI, P. E.; BAILEY, J.; MOORE, G.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P.; KOPF, G. Capacitation of mouse spermatozoa. Part 1. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. **Development**, v. 121, p. 1129-1137, 1995.
- VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1-6, 1998.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000.
- WANG, A. W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I.; ANDERSON, D. J.; LOUGHLIN, K. R. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, v. 49, p. 921-925, 1997.

- 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. 60-61, p. 481-492, 2000.
- WHITE, D. R.; AITKEN, R. J. Relationship between calcium cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. **Gamete Research**, v. 22, p. 163-177, 1989.
- WINDSOR, D. P.; WHITE, I. G. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial or frozen storage. **Animal Reproduction Science**, v. 40, p. 43-58, 1995.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994, p. 189-317.
- YEUNG, C. H.; COOPER, T. G.; DE GEYTER, M.; DE GEYTER, C.; ROLF, C.; KAMISCHKE, A.; NIESCHLAG, E. Studies on the origin of redox enzymes in seminal plasma and their relationship with results of in-vitro fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 835-839, 1998.
- ZANEVELD, L. J. D.; DE JONGE, C. J.; ANDERSON, R. A.; MACK, S. R. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. **Human Reproduction**, v. 9, p. 1265-1274, 1991.
- ZHENG, R.; ZHANG, H. Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation, and cyclic nucleotides. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n. 4, p. 581-586, 1997.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A – TALP *SPERM* MODIFICADO

1 SOLUÇÃO DE SAIS DE TALP (para preparar 500 mL)

Componentes:

- NaCl..... 2,100 g
- KCl..... 0,935 g
- NaH₂PO₄..... 0,025 g
- MgCl 6H₂O..... 0,040 g
- Hepes..... 3,250 g

Preparo:

- Diluir MgCl 6H₂O em 200 mL de água destilada
- Diluir outros sais em 200 mL de água destilada
- Combinar as duas soluções e completar para 500 mL
- Manter Refrigerado

2 SOLUÇÃO DOS METABÓLITOS GLICOSADOS

2.1 SOLUÇÃO ESTOQUE (PARA PREPARAR 50 mL)

Componentes:

- Glicose..... 2,50 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)

2.2 SOLUÇÃO TRABALHO

Preparo:

- Colocar 45 mL da solução de Sais de TALPm
- Colocar 5 mL da solução estoque de Metabólitos Glicosados
- Aliquotar (alíquotas de 250 µL)
- Ajustar pH para 7,4
- Manter em freezer (-20°C)

3 TALP SPERM MODIFICADO (preparo no dia)

Componentes:

- 10 mL da solução de Sais de TALPm
- 200 µL da solução trabalho de Metabólitos Glicosados

Preparo:

- Misturar os componentes e incubar por 10 minutos
- Ajustar o pH para 7,4

ANEXO B – AJUSTE DO IVOS – 12.3 PARA ANÁLISE DE SÊMEN EQUINO

Característica	Ajuste
Número de imagens adquiridas (Image capture: frames)	30
Taxa de aquisição das imagens (Image capture: frames per sec)	80 Hz
Contraste mínimo da célula (Cell detection: minimum contrast)	60 pixels
Tamanho mínimo da célula (Cell detection: minimum size)	3 pixels
Tamanho para células imóveis (Defaults: cell size)	0,32 a 1,51
Intensidade para células imóveis (Defaults: cell intensity)	30 pixels
Referência de VAP para células progressivas (Progressive cells: VAP)	30,0 µm/s
Referência de STR para células progressivas (Progressive cell: STR)	60 %
Referência de VAP para células lentas (Slow cells: VAP Cut-off)	20,0 µm/s
Referência de VSL para células lentas (Slow cells: VSL Cut-off)	20,0 µm/s
Limite superior de tamanho da célula (Qc plots: Static size gates-Max)	1,51 pixels
Limite inferior do tamanho da célula (Qc plots: Static size gates-Min)	0,32 pixels
Limite superior de intensidade da célula (Qc plots: Static intensity gates-Max)	1,19
Limite inferior da intensidade da célula (Qc plots: Static intensity gates-Min)	0,24
Limite superior de alongamento da célula (Qc plots: Cell elongation-Max)	98 %
Limite inferior de alongamento da célula (Qc plots: Cell elongation-Min)	0 %
Aumento (optics: Magnification)	1,89
Temperatura (Stage: Set stage temperature)	37°C