UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL

Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja

FABIANE GILLI ZAFFALON

SÃO PAULO
2009

FABIANE GILLI ZAFFALON

Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja

São Paulo

2009

FABIANE GILLI ZAFFALON

Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja

Dissertação 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 Mestre em Ciências

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

T.2200
FMVZ

Zaffalon, Fabiane Gilli
Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja / Fabiane Gilli Zaffalon. – 2009.
93 f. : il.

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

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

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Diluidores. 2. Hiperativação. 3. Reação acrossomal. 4. Sêmen criopreservado. 5. Touro I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos de diferentes diluidores sobre a criocapacitação e peroxidação lipídica no sêmen de touros da raça Nelore", protocolado sob o nº1669/2009, utilizando 10 (dez) touros, 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 em reunião de 20/05/09.

We certify that the Research "Effects of different extenders on the cryocapacitation and lipid peroxidation of nelore bulls semen", utilizing 10 (ten) bulls, protocol number 1669/2009, under the Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/20/09.

São Paulo, 21 de maio de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

1934 | 2009 USP 75 FMVZ

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

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

, **FOLHA DE AVALIAÇÃO**

Nome: ZAFFALON, Fabiane Gilli

Título: Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Assinatura: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Assinatura: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Assinatura: _____Julgamento: _____

Dedico com muito amor!

Ao meu Pai, Ferdinando Zaffalon

Como é difícil escrever essa dedicatória tentando expressar como o senhor, **PAI**, foi e sempre será importante para mim. Foram muitos ensinamentos, muito carinho, esforços imensos, histórias incríveis e sempre com muito amor, que ficarão na minha vida, como exemplo de caráter! Você me faz muita falta!

À minha mãe, Marília P. Gilli Zaffalon

Uma mulher muito "forte", uma **MÃE** que se dedicou aos filhos de forma intensa com muito amor, falando sempre a verdade e nos mostrando a forma mais honesta de viver!

Aos meus irmãos "Fefê" e Marcelo

IRMÃOS que sempre me deram apoio, cada um da sua forma, mas sempre estiveram ao meu lado com o amor mais puro e fraternal!

Aos meus sobrinhos Gabriel, Guilherme e Mahayana

Um trio que completam e alegram meus dias com suas histórias e carinhos!

Às mães de meus sobrinhos Érica e Fernanda

Que foram adotadas na minha família e que são minhas amigas na hora em que preciso sempre muito carinhosas!

Ao meu namorado Paulo

Acima de tudo um grande amigo que sempre me ajudou alegrando a minha vida!

AMO VOCÊS!!!!

AGRADECIMENTOS

Antes de agradecer peço desculpas, pois não sou boa para lidar de sentimentos ainda mais se tiver que escrevê-los, portanto serei breve nas palavras, mas podem ter certeza que sou eternamente grata a todos vocês.

Ao **Professor Rubens Paes de Arruda**, inicialmente agradeço pelo “sim” dito no dia em que pedi para realizar o mestrado com a sua equipe, me lembro do entusiasmo e da alegria que passei o resto daquele dia. Também devo a ele a visão que tenho hoje da minha profissão! Pois, acredito que não encontrarei outro profissional tão correto e digno de ser um MÉDICO VETERINÁRIO. Um verdadeiro EDUCADOR que faz questão de transmitir seus ensinamentos técnicos e éticos aos seus orientados.

Ao colega de pós graduação **André F. C. de Andrade**, meu querido amigo “braço curto” que me ajudou demais na realização desse experimento e me alegrou bastante com suas piadas maravilhosas.

À **Simone M. M. K. Martins**, que formatou essa dissertação e foi minha colega de pós graduação sempre muito sensata e prestativa.

Aos colegas de pós estrangeiros **Octavio Fabian B. Tarragó** (o paraguaio) e ao **Andres M. Gallego** (o colombiano-venezuelano) que me ajudaram na colheita de sêmen e na realização do experimento, respectivamente. E pelas risadas com suas histórias.

À **Juliana Nascimento** colega que sempre foi muito prestativa me ajudou bastante com as éguas e com as nossas conversas.

À **Pofessora Eneiva Carla C. Celeghini**, pessoa incrível, calma, atenciosa que corrigiu várias vezes a minha dissertação com muito carinho e competência.

Ao **Professor Ed H. Madureira**, pelas histórias contadas no corredor nos momentos de descontração, nunca esquecerei a do “cimento bem grosso” no tronco de bovinos.

A todos os demais **professores do Departamento de Reprodução Animal**, que tive contato em aulas ou em experimento agradeço os ensinamentos transmitidos.

Aos queridos funcionários do VRA – Pirassununga, **José Maria, Márcio, João, Edna e Clayton**, pessoas ótimas para conversar.

À **Harumi D. Shiraishi**, pela ajuda nas horas do sufoco.

À **Elza Faquim**, pela ajuda na reta final.

Ao **Paulo Fantinato Neto**, que esteve presente ajudando todas as colheitas de sêmen mesmo de sábado à noite embaixo de chuva.

À **Biotech Botucatu** pela gentileza de ter fornecido os diluidores utilizados neste experimento.

Aos estagiários que passaram por esses dois anos que estive no VRA, como não lembrarei o nome de todos agradeço em especial a **Ana Paula**, pois foi a estagiária que estava no momento da realização do meu experimento e que ajudou muito.

As minhas amigas **Lidielem, Patrícia** e **Renata** que mostraram muito carinho no momento em que mais precisei.

À **Talita** e ao **Tarley**, meus veterinários preferidos, amigos em qualquer hora e que possuem um bem muito preciso e gostoso a **Duda**.

Aos amigos que fiz na faculdade e que dei muitas risadas: **Bil, Dago, Glória, Luciano, Bruno, Kike, Joaquim, Bujão, Adriano, Bruna e Ximbica**.

Aos amigos que fiz na pós graduação: **Pati, Aline, Zé Rodrigo, Fernandos**.

Aos meus tios **Edson**, **Graça e sua família**, pessoas ótimas para conviver e muito queridos.

Aos meus tios **Osório, Cleuza, Joaquim e Catarina** e **“seus familiares”**, pessoas que me ajudam diariamente com muito amor e caridade, não sei se suportaria a vida sem a força deles.

RESUMO

ZAFFALON, F. G. **Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja.** Capacitation-like changes in bovine semen after cryopreservation using extenders on the egg yolk or soy lecithin. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de três diluidores diferentes na criopreservação do sêmen bovino sobre a motilidade, hiperativação espermática, reação acrossomal, capacitação e peroxidação lipídica das membranas espermáticas. Foram realizadas seis colheitas de sêmen em intervalos quinzenais de dez touros zebuínos da raça Nelore. O sêmen *in natura* foi avaliado, dividido em três tratamentos: uma fração foi diluída em meio a base de gema de ovo (Botu-Bov® - diluidor 1), a segunda fração diluída em meio a base de lecitina de soja (Botu-Bov® - diluidor 2) e a terceira fração em meio AndroMed® (diluidor 3) também a base de lecitina de soja. Logo após as amostras foram submetidas à congelação. As avaliações do sêmen após descongelação consistiram na análise computadorizada das características de motilidade e nas análises pela citometria de fluxo quanto à reação acrossomal (PI/FITC-PSA/H33342); peroxidação lipídica (PI/C11-BODIPY$^{581/591}$/H33342) e capacitação espermática através da estabilidade da membrana plasmática (Merocianina 540/Yo-Pro1/H33342). As variáveis foram submetidas à análise de variância e ao teste LSD para comparação das médias, ao nível de 5% de significância. O diluidor a base de gema de ovo preservou melhor a motilidade espermática, a população de células com integridade de membrana plasmática e acrossomo não reagido no sêmen bovino pós-descongelação que os diluidores a base de lecitina de soja. Os espermatozóides criopreservados com o diluidor a base de gema de ovo apresentou menor sub população de células hiperativas e com membrana plasmática desestabilizada quando comparados com os diluidores a base de lecitina de soja e o diluidor a base de gema de ovo possibilitou uma diminuição da peroxidação lipídica das membranas espermáticas.

Palavras–chave: Diluidores. Hiperativação. Reação acrossomal. Sêmen criopreservado. Touro.

ABSTRACT

ZAFFALON, F. G. **Capacitation-like changes in bovine semen after cryopreservation using extenders within egg yolk or soy lecithin**. [Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja]. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The objective of this experiment was evaluate the effects of three diferent extenders in bovine semen cryopreservation about motility, sperm hiperactivation, acrosome reaction, capacitation, and sperm membrane lipid peroxidation. It was made six collection of semen samples each 15 days of 10 Nelore bulls. Semen samples *in natura* was verify and divided in three treatments: The first one was extended in egg yolk base (Botu-Bov® Extender 1), second one was extended in soy lecithin base (Botu-Bov® Extender 2) and the third was extended in AndroMed® soy lecithin base too. After that, semen samples were submitted to freeze process. Semen evaluations after thawing were made with computer assisted sperm analysis (CASA) and flow citometry for acrosome reaction (PI/FITC-PSA/H33342), lipid peroxidation (PI/C11-BODIPY$^{581/591}$/H33342) and sperm capacitation by plasma membrane stability (Merocianina 540/Yo-Pro1/H33342). Data obtained from experimental proceeding were submitted to variance analysis and LSD test to compare means with 5% of significance. Egg yolk base extender preserved better sperm motility, cell population with plasma membrane integrity and non-reacted acrosome in bovine semen after thawing than soy lecithin extenders. Cryopreserved sperm with egg yolk base extender displayed less subpopulation of hiperactivated cells, less destabilized plasma membrane and permitted a decrease of lipid peroxidation of membranes when it was compared with soy lecithin extender.

Keywords: Acrosome reaction. Bull. Cryopreserved semen. Extender. Hyperactivation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quadro de análise de variância para delineamento com nove blocos e três tratamentos - Pirassununga-SP – 2009.....61

Tabela 2 – Médias ± erros padrão das características do movimento espermático (CASA) do sêmen bovino após descongelação nos três diferentes tratamentos – Pirassununga - 2009.....63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema Experimental 54

Figura 2 - Programa Edit/Sort do aparelho HTM-IVOS, versão 12.3, Hamilton Thorne Research, Beverly, Massachusetts, USA - Pirassununga – 2009 56

Figura 3 - Gráfico de pontos gerados pela análise por citometria de fluxo. Amostra corada com a associação H33342, IP e FITC-PSA, permitindo a classificação dos espermatozóides bovinos em quatro categorias - Pirassununga - SP 57

Figura 4 - Gráfico de pontos gerados pela análise por citometria de fluxo. Amostra corada com a associação H33342, Yo-Pro e Merocianina, permitindo a classificação dos espermatozóides bovinos em três categorias – Pirassununga - 2009 59

Figura 5 - Gráfico de pontos gerados pela análise por citometria de fluxo. Amostra corada com a associação H33342, C11-BODIPY e IP, permitindo a classificação dos espermatozóides bovinos em três categorias – Pirassununga – SP.....60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Médias ±erros padrão da quantidade de células espermáticas (%), após descongelação, com membrana plasmática íntegra nos três tratamentos diferentes – Pirassununga - 2009.....65

Gráfico 2 - Médias ± erros padrão da quantidade de células espermáticas (%), após descongelação, com reação acrossomal, nos três diferentes tratamentos – Pirassununga - 2009 65

Gráfico 3 - Médias ±erros padrão da quantidade de células espermáticas (%), após descongelação, com membrana plasmática íntegra e sem reação acrossomal (acrossomo íntegro) nos três diferentes tratamentos – Pirassununga - 2009 66

Gráfico 4 - Médias ±erros padrão da quantidade de células espermáticas (%), após descongelação, com membrana plasmática íntegra estável nos três diferentes tratamentos – Pirassununga - 2009.....67

Gráfico 5 - Médias ±erros padrão da quantidade de células espermáticas (%), após descongelação, membrana plasmática íntegra desorganizada nos três diferentes tratamentos – Pirassununga – 2009 68

Gráfico 6 - Médias ±erros padrão dos valores lineares médios da intensidade de fluorescência da população espermática com membrana plasmática íntegra apresentando peroxidação lipídica, no sêmen após descongelação nos três diferentes tratamentos – Pirassununga - 2009 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL microlitro

µm micrômetro

µm/s micrômetro por segundo

µM micromolar

AIMI membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida

AIML membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida

ALMI membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida

ALML membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida

ALH amplitude lateral da cabeça

BCF freqüência de batimento

C11-BODIPY$^{581/591}$ 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3ª,4ª-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid

Ca^{2+} íon cálcio

AMPc adenosina-monofosfato ciclica

CASA *Computer Assisted Semen Analisys* (Análise Computadorizada do Sêmen)

CAT Catalase

DNA ácido desoxirribonucléico

ROS espécies reativas de oxigênio

FITC isotiocianato de fluoresceína

g grama

H258 Hoechst 33258

H_2O_2 peróxido de hidrogênio

H33342 Hoechst 33342

HO_2 hidroperoxil

HOCl ácido hipocloroso

Hz Hertz

IA inseminação artificial

IFMI intensidade de emissão de fluorescência do sêmen peroxidado com membrana plasmática íntegra

IFML intensidade de emissão de fluorescência do sêmen peroxidado com membrana plasmática lesada

IFPER intensidade de emissão de fluorescência da amostra peroxidada

IP iodeto de propídio

K^+ íon potássio

kDa quilodalton

LDL lipoproteína de baixa densidade

LIN linearidade

mg miligrama

Mg^{2+} íon magnésio

min minuto

mL mililitro

mM milimolar

MID espermatozóide com a membrana plasmática íntegra desorganizada.

ML membrana plasmática lesada.

MND espermatozóide com membrana plasmática íntegra organizada.

MP motilidade progressiva

MT motilidade total

Na^+ íon sódio

nm nanômetro

$O_2^{-\bullet}$ ânion superóxido

OH^- radicais hidroxil

p nível de significância

pH concentração de íons de hidrogênio

PKA proteína quinase A

PSA aglutinina de *Pisum sativum*

$RO^\bullet$ alcoxil

ROO^- peroxil

Rp-cAMPS antagonista do cAMP

s segundos

SAS Statistical Analysis System (Sistema de Análise Estatística)

STR retilinearidade

TALP meio de Tyrode suplementado com albumina, lactato e piruvato

TALP *sperm* meio de Tyrode suplementado com lactato e piruvato e sem adição de CaCl $2H_2O$ e $NaHCO_3$

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
≤	menor ou igual que
>	maior que
≥	maior ou igual que
±	mais ou menos
-	menos / negativo
+	mais/positivo
=	igual
°	grau

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

2 REVISÃO DE LITERATURA 24

2.1 O ESPERMATOZÓIDE 24

2.1.1 CABEÇA DO ESPERMATOZÓIDE 25

2.1.2 FLAGELO 26

2.2 MEMBRANA PLASMÁTICA 27

2.3 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO (CASA) 29

2.4 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA 32

2.5 HIPERMOTILIDADE 36

2.6 REAÇÃO ACROSSOMAL 37

2.7 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA 38

2.8 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN 40

2.8.1 CRIOPROTETORES 41

2.9 MUDANÇAS SEMELHANTES À CAPACITAÇÃO (CRIOCAPACITAÇÃO) 44

3 OBJETIVO 46

4 HIPÓTESE 48

5 MATERIAL E MÉTODOS 50

5.1 LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL 50

5.2 ANIMAIS E MANEJO 50

5.3 COLHEITA DO SÊMEN 51

5.4 AVALIAÇÕES DO SÊMEN *IN NATURA* 51

5.5 DILUIÇÃO E PREPARO DO SÊMEN 52

5.6 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN 52

5.7 AVALIAÇÃO DO SÊMEN PÓS-CRIOPRESERVAÇÃO 53

5.8 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DAS CARACTERÍSTICAS DA MOTILIDADE E HIPERATIVAÇÃO ESPERMÁTICA 54

5.9 AVALIAÇÃO DA REAÇÃO ACROSSOMAL E INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO 56

5.10 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO 58

5.11 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO DA MEMBRANA ESPERMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO 59

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA 60

6 RESULTADOS.....63

6.1 EFEITOS DOS DIFERENTES DILUIDORES NAS CARACTERÍSTICAS DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO (CASA) 63

6.2 EFEITOS DOS DIFERENTES DILUIDORES SOBRE A REAÇÃO ACROSSOMAL E MEMBRANA PLASMÁTICA 64

6.3 EFEITOS DOS DIFERENTES DILUIDORES SOBRE A ESTABILIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA 66

6.4 EFEITOS DOS DIFERENTES DILUIDORES SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA ESPERMÁTICA.....68

7 DISCUSSÃO 71

8 CONCLUSÕES 78

REFERÊNCIAS.....80

ANEXOS 91

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O Brasil com mais de oito milhões de quilômetros quadrados é o maior país da América do Sul, e o quinto no mundo, esta extensão favorece principalmente a pecuária de corte. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2009) o país possuía em 2008 um rebanho bovino de aproximadamente 190 milhões de animais e uma produção anual de nove milhões de toneladas de carne.

Várias biotécnicas reprodutivas são utilizadas como ferramenta para o melhoramento genético do rebanho brasileiro, porém, a mais utilizada e com custo mais acessível é a inseminação artificial. Desta forma, a criopreservação do espermatozóide tornou-se um procedimento essencial para a aplicação desta biotecnologia (PARKS, 1997; CELEGHINI, 2005).

A inseminação artificial com sêmen congelado está associada a uma redução da fertilidade, quando comparado ao sêmen *in natura*, a qual vem sendo atribuída aos processos ocorridos durante a congelação do sêmen (WATSON, 1995). Diluição, refrigeração, congelação, armazenamento e descongelação são as etapas que constituem o processo de criopreservação. Segundo Hammersted et al. (1990) cada um desses passos tem sua relação com a estrutura funcional das membranas e metabolismo celular. A preservação das estruturas espermáticas após a descongelação é obtida pela interação entre diluidor, crioprotetor, curvas de refrigeração, congelação e descongelação, buscando minimizar os danos causados pelo choque frio, formação de cristais de gelo e desidratação celular (AMMAN; PICKETT, 1987; JASKO, 1994).

Para fornecer maior proteção aos compartimentos celulares diluidores diferentes vem sendo empregados. Por mais de 60 anos os diluidores contendo gema de ovo tem sido utilizados, porém existem atualmente diversos argumentos contra seu uso dentre os quais: a grande variabilidade de sua composição, o risco de uma contaminação microbiana e o receio da introdução de doenças exóticas quando comercializado entre diferentes países. O uso de diluidores quimicamente definidos livre de proteína animal para a criopreservação do sêmen evitaria esses

problemas. Uma alternativa apresentada para a substituição da gema de ovo são os diluidores a base de lecitina de soja (AIRES et al., 2003).

Após a ejaculação os espermatozóides ainda não são capazes de fertilizar o oócito, mas adquirem tal competência após um período no aparelho reprodutivo da fêmea. Essas alterações fisiológicas são chamadas de capacitação que é definida como uma série de modificações que ocorrem no espermatozóide para que este se ligue à zona pelúcida do oócito (LAMIRANDE et al., 1997; GADELLA, 2008). Durante este processo, há extensas alterações, ocorrendo aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular, no pH, na adenosina-monofosfato cíclica (AMPc) e na fosforilação do aminoácido tirosina (VISCONTI; KOPF, 1998; PONS-REJRAJI et al., 2009).

Como conseqüência da capacitação, o espermatozóide passa a ser responsivo ao estímulo que induz a reação acrossomal e desenvolve um padrão particular de motilidade conhecido como hiperativação ou hipermotilidade (LAMIRANDE et al., 1997; GABALDI et al., 2002; MURATORI et al., 2004; LUCONI et al., 2005). Contudo, o mecanismo que engloba a capacitação ainda não foi completamente esclarecido.

Um dos fatores associados à redução da longevidade do espermatozóide criopreservado são as modificações geradas nas membranas espermáticas durante os processos de congelação. Estas alterações assemelham-se às ocorridas nas células capacitadas e isso levou alguns autores a pensarem na hipótese de que a criopreservação promove uma capacitação precoce do espermatozóide (BAILEY et al., 2000; HALLAP et al., 2006; ANDRADE, 2009).

O sistema de avaliação computadorizada do espermatozóide (CASA – *Computer Assisted Sperm Analyses*) tem sido utilizado na tentativa de minimizar os efeitos da avaliação subjetiva do sêmen. Também está sendo utilizado na pesquisa para a detecção do processo de hiperativação da motilidade espermática. Este padrão de movimento é apresentado pelo aumento da amplitude do batimento flagelar (VERSTEGEN et al., 2002; MUIÑO et al., 2008a; SUAREZ, 2008).

A associação de sondas fluorescentes, de forma a permitir a avaliação simultânea dos componentes celulares do espermatozóide, é de fundamental importância para separar uma população de células que apresente características desejáveis para que sejam capazes de fertilizar o oócito (CELEGHINI et al., 2007).

A sonda Merocianina 540 associada com o Yo-Pro-1 e o Hoechst 33342 pode ser utilizada para avaliar a desorganização da membrana espermática semelhante a que ocorre na capacitação. Esta técnica é realizada pela citometria de fluxo (HARRISON et al., 1996; HALLAP et al., 2006; ANDRADE, 2009).

Outra associação de sondas que é amplamente utilizada pela técnica de citometria de fluxo é o uso em conjunto do FITC-PSA, iodeto de propídio e Hoechst 33342 utilizada para avaliar a reação acrossomal (SILVA; GADELLA, 2006; CELEGHINI et al., 2007; ANDRADE, 2009).

A produção de espécies reativas de oxigênio faz parte do funcionamento normal das células espermáticas, em baixas concentrações estão envolvidas com a hiperativação dos espermatozóides, sendo sua produção um pré-requisito para a capacitação espermática (BROUWERS; GADELLA, 2003; RAPHAEL, 2007). Para a quantificação da peroxidação lipídica é utilizada a associação das sondas C11-BODIPY$^{581/591}$ com o iodeto de propídio e Hoechst 33342 pela técnica de citometria de fluxo (SILVA; GADELLA, 2006; ANDRADE, 2009).

Este trabalho foi proposto com o objetivo de comparar os efeitos de três diluidores diferentes (um a base de gema de ovo e dois a base de lecitina de soja) sobre as alterações intracelulares semelhantes a da capacitação, reação acrossomal, hiperativação e na produção de espécies reativas de oxigênio, após o processo de congelação e descongelação dos espermatozóides bovinos.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para uma melhor compreensão do delineamento realizado neste experimento é importante revisar alguns aspectos relacionados à célula espermática, bem como as modificações fisiológicas que o espermatozóide passa para conseguir fertilizar o oócito, outros aspectos importantes são relacionados ao processo de criopreservação do sêmen, com destaque aos diluidores usados neste processo, bem como as técnicas utilizadas para a avaliação do sêmen.

2.1 O ESPERMATOZÓIDE

A espermatogênese inicia-se nos mamíferos na puberdade e é a soma total de eventos que ocorrem dentro dos túbulos seminíferos nos testículos para a produção dos espermatozóides (FLESCH; GADELLA, 2000; JOHNSON et al., 2000; MRUK; CHENG, 2004). Neste processo a espermatogônia se divide através de mitose e produz o espermatócito primário que passa pela primeira divisão meiótica originando o espermatócito secundário, que por sua vez, passa pela segunda divisão meiótica para produzir espermátides haplóides que se diferenciam em espermatozóides. Em bovinos este processo tem uma duração de aproximadamente 61 dias (JOHNSON et al., 2000). Na maioria das espécies mamíferas as células espermáticas estão totalmente maturadas quando atingem a cauda do epidídimo (FLESCH; GADELLA, 2000; JOHNSON et al., 2000). No epidídimo, o espermatozóide adquire o potencial de motilidade pela ação das secreções das células epiteliais e constituintes dos fluidos luminais (LAMIRANDE et al., 1997).

Os espermatozóides são células alongadas divididas em dois componentes principais que são a cabeça e o flagelo. A principal função da cabeça é a liberação do material genético, contido no núcleo, para o oócito e a do flagelo fornecer motilidade à célula para sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e penetração através da zona pelúcida do oócito (MORTIMER, 1997).

2.1.1 CABEÇA DO ESPERMATOZÓIDE

A cabeça do espermatozóide contém uma pequena quantidade de citoplasma, o núcleo e o acrossomo (ÕURA; TOSHIMORI, 1990; FLESCH; GADELLA, 2000). A principal característica da cabeça é o núcleo achatado, contendo cromatina altamente condensada para que seu volume seja minimizado para o transporte (ALBERTS, 1994).

Na parte anterior da cabeça espermática há uma vesícula secretória especializada, chamada de acrossomo, que se espalha recobrindo o núcleo (ALBERTS, 1994; FLESCH; GADELLA, 2000; GARNER; HAFEZ, 2004). O acrossomo tem um importante papel durante o processo de fertilização. Esta organela é derivada do complexo de Golgi e é formada durante o estágio inicial da espermiogênese (CROSS; MEIZEL, 1989; ABOU-HAILA, 2000; ZHANG; LIN, 2002).

Segundo Silva e Gadella (2006) o acrossomo é repleto de enzimas hidrolíticas localizadas na matriz acrossomal. Além de uma variedade de proteinases, fosfatases, esterase e sulfatases necessárias para a penetração do espermatozóide na matriz extracelular do oócito (ABOU-HAILA, 2000; FLESCH; GADELLA, 2000).

O acrossomo consiste de dois segmentos, a capa acrossomal (acrossomo anterior) e o segmento equatorial (acrossomo posterior). É composto pelas membranas acrossomais externa e interna. A primeira está em contato com o lado interno da membrana plasmática e durante a reação acrossomal elas se fundem e formam vesículas que liberam o conteúdo acrossomal. Já a membrana acrossomal interna está em contato com a membrana nuclear e juntamente com o segmento equatorial persiste durante o processo de reação acrossomal até a fusão do espermatozóide com o oócito (ÕURA; TOSHIMORI, 1990; FLESCH; GADELLA, 2000).

O acrossomo deve se manter intacto antes e durante o trajeto do espermatozóide até a sua ligação com a zona pelúcida no istmo. Uma reação acrossomal precoce leva a infertilidade espermática (SILVA; GADELLA, 2006).

Pelo fato da perda acrossomal também ocorrer em espermatozóides em degeneração, considera-se essencial distinguir o processo de reação acrossomal

em células viáveis ou não viáveis (CROSS; MEIZEL, 1989; COOPER; YEUNG, 1998). Portanto, faz sentido avaliar a integridade acrossomal dos espermatozóides utilizados nas técnicas de reprodução assistida (SILVA; GADELLA, 2006).

A integridade acrossomal é comumente avaliada com o uso de lecitinas conjugadas a fluoresceínas. Os conjugados de lecitina mais utilizados são o *Pisum sativum* (PSA) ou o *Arachis hypogaea* (PNA) (CROSS; MEIZEL, 1989; SILVA; GADELLA, 2006).

A *Pisum sativum* (PSA), é uma aglutinina da ervilha, que se liga aos glicoconjugados da matriz acrossomal e tem afinidade para as terminações α-D-glicosil e resíduos α-D-manosil das glicoproteínas e liga-se especificamente ao açúcar α-manosidase encontrado no conteúdo acrossomal (CROSS et al., 1986; SUKARDI et al., 1997; CELEGHINI et al., 2007). Acrossomos lesados são identificados e visualizados por essa aglutinina conjugada a isotiocionato de fluoresceína (FITC) que os marca de verde amarelado (CROSS et al., 1986; CHENG et al., 1996). O FITC-PSA apresenta sua excitação e emissão, respectivamente, no comprimento de onda de 488 nm / 530 nm (CENTOLA et al., 1990; SUKARDI et al., 1997).

2.1.2 FLAGELO

O flagelo é a primeira estrutura a se desenvolver durante a espermatogênese com o recrutamento das mitocôndrias do citoplasma para formar um arranjo helicoidal em sua peça intermediária (FLESCH; GADELLA, 2000).

Internamente, o flagelo é constituído por nove microtúbulos duplos dispostos em volta de dois microtúbulos simples centrais, esta estrutura é chamada de axonema. Unindo cada par de microtúbulo periférico encontra-se a dineína, a qual é responsável pela hidrólise de ATP em ADP e fosfato inorgânico, transformando a energia química em trabalho mecânico permitindo o deslizamento dos microtúbulos que leva ao batimento axonemal (COSSON, 1996; MORTIMER, 1997, 2000).

De acordo com Cosson (1996) e Mortimer (1997), o flagelo é composto pela peça intermediária, peça principal e peça terminal. A peça intermediária contém mitocôndrias dispostas em um arranjo espiral que produz a energia necessária para o movimento espermático e se estende do colo até o anulus. A peça principal se estende do anulus até a peça terminal e possui uma bainha fibrosa que rodeia o axonema fornecendo um suporte ao movimento flagelar. A peça terminal é composta apenas pelo axonema coberto pela membrana plasmática.

2.2 MEMBRANA PLASMÁTICA

A membrana plasmática define os limites das células e mantêm a divisão entre os meios intra e extracelulares. Apesar de diferenças funcionais, toda membrana biológica tem uma estrutura geral comum: uma camada fina de lipídeos e proteínas ligadas por interações não covalentes. As membranas são estruturas fluidas, dinâmicas e assimétricas, onde a composição de lipídeos e proteínas da face interna e externa difere relacionando-se com o modo que exercem suas funções (PARKS; GRAHAM, 1992; ALBERTS, 1994).

As camadas de lipídeos são arranjadas como uma dupla camada que fornece a estrutura básica e serve como uma barreira relativamente impermeável a passagem da maioria das moléculas solúveis em água (ALBERTS, 1994).

As proteínas realizam o transporte específico de moléculas. Algumas servem como sítios estruturais que conectam a membrana ao citoesqueleto ou a células adjacentes e outras são receptoras que detectam e traduzem sinais químicos do ambiente celular (ALBERTS, 1994).

A composição lipídica da membrana plasmática espermática é composta aproximadamente de 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros (colesterol) e 5% de glicolipídeos (FLESCH; GADELLA, 2000).

Todos os lipídeos das membranas são anfipáticos, ou seja, possuem uma extremidade hidrofílica e outra hidrofóbica. Uma das características mais importantes das membranas é a sua fluidez, essencial para suas funções (PARKS; GRAHAM, 1992; ALBERTS, 1994).

A fluidez correta da membrana, dependente de sua composição e sua temperatura, é biologicamente importante para processos de transporte e atividade enzimática, podendo cessar quando a viscosidade da bicamada é aumentada (ALBERTS, 1994).

Os principais fosfolipídios presentes nas membranas são a fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina. As duas metades da bicamada são diferentes devido à disposição dos quatro fosfolipídios principais, o único com carga negativa é a fosfatidilserina (PARKS; GRAHAM, 1992; ALBERTS et al., 1994). Durante a capacitação os níveis da fosfatidilcolina podem aumentar devido a metilação da fosfatidiletanolamina (FLESCH; GADELLA, 2000) .

Entre os lipídios neutros é onde encontramos maiores variações na composição das membranas espermáticas nas diferentes espécies. O colesterol acentua as propriedades de permeabilidade da bicamada. As altas concentrações de colesterol nas membranas plasmáticas tendem a diminuir a fluidez (PARKS; GRAHAM, 1992). Segundo Aitken et al. (1998) e Flesch e Gadella (2000), tem sido demonstrado que o colesterol é esgotado da membrana plasmática espermática após a capacitação.

Apesar da estrutura básica das membranas biológicas ser a bicamada lipídica, a maioria das funções específicas é conduzida pelas proteínas. O tipo e a quantidade das proteínas são altamente variáveis. Como os lipídios as proteínas transmembranais também são anfipáticas (ALBERTS, 1994).

Os espermatozóides dos mamíferos são as únicas células constituídas por partes com estruturas e funções distintas cercadas por uma única membrana plasmática contínua. Na célula espermática identificam-se três regiões especializadas da membrana plasmática que são a cabeça, a peça intermediária e o flagelo. A membrana plasmática da cabeça é separada da membrana plasmática da peça intermediária pelo anel posterior que por sua vez é separado da membrana plasmática do flagelo pelo anel anular (FLESCH; GADELLA, 2000).

Como o espermatozóide não possui a maioria das organelas comuns a outros tipos celulares e sua transcrição de DNA é suspensa, a síntese de novos componentes para a membrana plasmática torna-se impossível (EDDY; O'BRIEN, 1994; JONES et al., 2007; ANDRADE, 2009). Dessa maneira, danos na membrana

plasmática levam a perdas irreversíveis da motilidade e/ou da capacidade de fertilização (MORRIS; HUNTER; ALLEN, 2000; ANDRADE, 2009).

A integridade da membrana plasmática é geralmente avaliada por sondas fluorescentes membrana-impermeável, essas sondas possuem afinidade pelo DNA e coram apenas células com membrana plasmática lesada. Diferentes sondas são utilizadas com esse propósito, tais como: Hoechst 33258, YoPro-1, Iodeto de propídio (PI), ToPro-3 e TOTO (SILVA; GADELLA, 2006).

O PI cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada. Esse corante vem sendo amplamente utilizado na microscopia de epifluorescência ou na citometria de fluxo (GRAHAM et al., 1990; GARNER et al., 1997; THOMAS et al., 1998; ARRUDA, 2000; CELEGHINI et al., 2007). Possui, respectivamente, excitação e emissão no comprimento de onda de 488 nm / 675 nm.

O YoPro-1 apresenta excitação com 488 nm e emite luz verde (530 nm), possui forte afinidade pelos ácidos nucléicos do DNA e foi introduzido na avaliação espermática tornando possível sua utilização na citometria de fluxo (MARIE et al., 1996; HALLAP et al., 2006).

Um método alternativo ou simultâneo para o estudo da integridade de membrana é o uso de corantes que possuem moléculas de acetil e por essa característica são anfipáticos e conseguem penetrar na membrana íntegra são eles SYBR-14, CFDA e o Hoechst 33342 (SILVA; GADELLA, 2006).

O Hoechst 33342 atua como um marcador de membrana plasmática intacta corando a célula de azul (MAXWELL et al., 1997; CELEGHINI, 2005). Este corante, na citometria de fluxo, é utilizado em conjunto com outras sondas para que não haja a contagem de forma equivocada de partículas com o mesmo tamanho e granulosidade do espermatozóide presentes nos diluidores (HALLAP et al., 2006). Possui excitação de 350 nm e emissão de 461 nm.

2.3 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO (CASA)

Grande variedade de biotécnicas para a avaliação do espermatozóide tem sido desenvolvida, entre elas, está a avaliação computadorizada do sêmen (CASA),

que é utilizada para quantificar a motilidade espermática (ARRUDA et al., 2003; CELEGHINI et al., 2008).

A análise da qualidade espermática tem sido baseada pela avaliação subjetiva dos parâmetros espermáticos. Na tentativa de minimizar os efeitos da avaliação subjetiva do sêmen, vários sistemas de avaliação computadorizada do sêmen têm sido aplicados na avaliação espermática atualmente (VERSTEGEN et al., 2002; QUINTERO-MORENO et al., 2003).

Arruda (2000) relatou estudos que mostraram a alta correlação do sistema CASA com o método convencional de análise de sêmen, desta forma, os autores destes estudos concluíram que a análise computadorizada da motilidade pode ser uma alternativa rápida, objetiva e confiável para a avaliação rotineira de amostras de sêmen ou para pesquisa.

A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozóides é de grande interesse devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade destes (ARRUDA, 2000).

Os aparelhos utilizados no sistema CASA variam amplamente e são baseados na óptica e softwares utilizados na identificação espermática e reconstituição de sua trajetória (VERSTEGEN et al., 2002). De maneira simplificada, o modo de avaliação é realizado através da observação de amostras de espermatozóides que posteriormente são identificados em imagens sucessivas estabelecendo suas trajetórias. Estas por sua vez são matematicamente processadas permitindo uma definição numérica. Os resultados desses processamentos são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato momento de cada espermatozóide (QUINTERO-MORENO et al., 2003).

A obtenção de resultados seguros na avaliação espermática computadorizada depende de uma preparação cuidadosa da amostra e um ajuste adequado do equipamento (Setup) visando identificar corretamente as células imóveis, móveis e outras partículas que não são espermatozóides (VERSTEGEN et al., 2002).

Segundo Mortimer (1997) e Arruda (2000) os parâmetros gerados pelo sistema CASA mais utilizados são: ***motilidade total*** (MT), que é expressa em porcentagem e é a razão das células móveis na concentração espermática total; ***motilidade progressiva*** (MP) expressa em porcentagem e é a razão das células

móveis com movimento progressivo na concentração espermática total; ***velocidade progressiva*** (VSL) expressa em μm/s e é a distância considerando-se uma linha reta entre o ponto inicial e o ponto final da trajetória dividido pelo tempo decorrido; ***velocidade curvilinear*** (VCL) referente à velocidade média expressa em μm/s da distância total entre cada posição do centro da célula durante a captura da imagem, dividida pelo tempo decorrido ou a distância percorrida pelo espermatozóide ao longo do seu caminho curvilinear, é calculada pela somatória das distâncias ao longo da trajetória e então corrigida pelo tempo; ***velocidade de trajeto*** (VAP) expressa em μm/s, corresponde à velocidade média ininterrupta do caminho da célula, sendo a indicação do comprimento da trajetória geral do espermatozóide e é calculada encontrando o comprimento do caminho médio corrigido pelo tempo esse algorítimo é usado para reduzir os efeitos da amplitude e deslocamento lateral de cabeça, obtendo-se uma trajetória mais representativa da posição espermática ao longo do movimento; ***retilinearidade*** (STR) expressa em porcentagem é a medida do afastamento da trajetória da célula espermática considerando-se uma linha reta, é a indicação da relação entre o espaço ganho e a trajetória total do espermatozóide, calculada pela relação entre VSL/VAP x 100 (%); ***linearidade*** (LIN) expressa em porcentagem é a medida do afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta. É a razão entre VSL/VCL x 100 (%).

Ainda são incluídas a ***amplitude do deslocamento lateral da cabeça*** (ALH) que é expressa em μm e corresponde à largura média da oscilação da cabeça durante seu deslocamento, que é utilizada como uma aproximação do batimento flagelar; e a ***freqüência de batimentos*** (BCF) expressa em Hertz (Hz) e é determinada pela medida da freqüência com que a linha da cabeça espermática atravessa a trajetória celular em qualquer direção, foi desenvolvida visando fornecer indicações da freqüência do batimento flagelar baseada nos fatos de que cada ponto é resultado da mudança do batimento, e que cada momento que o caminho curvilíneo cruza o caminho médio é o resultado de um novo batimento flagelar, assumindo que o espermatozóide gira a cada início de batimento (MORTIMER, 1997; ARRUDA, 2000).

O CASA pode ser utilizado para detectar o movimento característico apresentado pelo espermatozóide durante a hiperativação (MORTIMER; MAXWELL, 1999; VERSTEGEN et al., 2002; SUAREZ, 2008). Porém, até recentemente essa

avaliação não era tão eficiente. No entanto, a melhora da resolução do sistema óptico dos aparelhos permitiu uma melhor observação da trajetória das células possibilitando a avaliação de espermatozóides com maior velocidade e trajetos não retilíneos. Não há um consenso que defina os critérios da motilidade hiperativada, porém, existe um consenso universal de que os parâmetros que distinguem o espermatozóide hiperativado são: alto VCL e baixa linearidade ainda que existam variações dos valores obtidos nos trabalhos (VERSTEGEN et al., 2002).

Marquez e Suarez (2007) e Muiño et al. (2008a) realizaram estudos dos parâmetros cinéticos da motilidade espermática e para avaliar a hiperativação da motilidade utilizaram os seguintes parâmetros descritos por Mortimer (1997): VCL ≥ 180, LIN ≤ 45 e ALH max > 10. Por não ser uma medida direta do batimento flagelar o ALH é uma medida imperfeita, no entanto, o sistema CASA compensa esta falta de acurácia com a aquisição de dados de centenas de espermatozóides em menos de um minuto (SUAREZ, 2008).

2.4 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

Após deixar os testículos os espermatozóides ainda não adquiriram a motilidade progressiva nem a habilidade de fertilizar o oócito. Durante o trânsito no epidídimo, a célula espermática adquire a habilidade de se mover progressivamente, no entanto, ela ainda é incapaz de fertilizar. Essa capacidade é obtida pela passagem no trato reprodutivo feminino. As mudanças fisiológicas que conferem ao espermatozóide a habilidade de fertilizar são coletivamente chamadas de capacitação (LAMIRANDE et al., 1997; VISCONTI; KOPF, 1998; BREITBART, 1999; LUCONI et al., 2005; SARAVIA et al., 2007). Para Gadella (2008) a capacitação é definida como o processo pelo qual o espermatozóide torna-se hábil para fertilizar.

Como conseqüência da capacitação, o espermatozóide passa a ser responsivo ao estímulo que induz a reação acrossomal e desenvolve um padrão particular de motilidade conhecido como hiperativação ou hipermotilidade (MURATORI et al., 2004).

Segundo Lamirande et al. (1997); Visconti e Kopf (1998) e Saravia et al. (2007), a capacitação foi descrita primeiramente por Chang e Austin, no ano de 1951, em estudos independentes. A definição deste assunto pouco compreendido tem sido modificada ao longo dos anos pois alguns pesquisadores incluem neste processo a reação acrossomal enquanto outros não (LAMIRANDE et al., 1997).

Após 50 anos da descoberta da capacitação as bases moleculares ainda não foram totalmente entendidas (HARRISON et al., 1996). Entretanto, acredita-se que um dos principais eventos da capacitação seja a remoção ou alteração de estabilizadores ou fatores protetores da membrana plasmática, adquiridos durante o trânsito pelo epidídimo ou exposição ao plasma seminal, os quais levariam a membrana a uma condição propícia para a fertilização (FERRARI, 1997).

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 AMPc e a fosforilação do aminoácido tirosina (AITKEN et al., 1995; VISCONTI et al., 1995; VISCONTI; KOPF, 1998; BREITBART, 1999; WERTHEIMER et al., 2008; ANDRADE, 2009).

A capacitação pode ser mimetizada *in vitro* em um meio definido cuja composição é baseada na concentração de eletrólitos que compõem o fluido da tuba uterina, sugerindo que este processo seja intrinsecamente modulado pelo espermatozóide (VISCONTI; KOPF, 1998; GADELLA, 2008).

A albumina sérica está relacionada à extração do colesterol da membrana plasmática. A retirada desse esterol é seguida por uma alteração da fluidez da membrana (VISCONTI; KOPF, 1998). Nas espécies cuja membrana é rica em colesterol (humanos e bovinos), tais eventos não são evidenciados na mesma velocidade como nas espécies com pouco colesterol na membrana (suínos e ovinos). Devido a isto, o tempo para capacitação varia, em decorrência da necessidade de um maior tempo para as espécies com alto nível de colesterol (FLESCH; GADELLA, 2000).

O cálcio é um componente capacitante que tem seu papel ainda não totalmente conhecido. Alguns autores descrevem um aumento de cálcio intracelular durante a capacitação, porém outros mostram que a concentração de cálcio intracelular não é alterada durante este evento. Parte desta controvérsia pode ser atribuída pela ação do cálcio na reação acrossomal e na inerente dificuldade em diferenciar esses eventos (LAMIRANDE et al., 1997; VISCONTI; KOPF, 1998). Para Flesch e Gadella (2000), é difícil avaliar o papel direto que o cálcio exerce sobre a fosforilação da aminoácido tirosina, pois vários processos necessitam dele e diferem entre espécies.

Segundo Flesch e Gadella (2000), a concentração de bicarbonato é baixa na cauda do epidídimo, aproximadamente menor que 1 mM. Quando chegam ao genital feminino encontram concentrações muito superiores, da ordem de 15 mM. Essas diferenças na concentração de bicarbonato no trato reprodutivo masculino e feminino podem desempenhar um importante papel na supressão da capacitação no epidídimo e na promoção do processo no trato reprodutivo feminino. Sua ausência inibe a fosforilação da tirosina e também reduz a capacidade dos espermatozóides de se ligarem às proteínas solubilizadas da zona pelúcida (VISCONTI; KOPF, 1998).

O bicarbonato é considerado desencadeador da capacitação, induzindo diretamente uma adenilato ciclase espermatozóide específica que atua na ativação da proteína quinase A, a qual via fosforilação do aminoácido tirosina ativa direta ou indiretamente o deslocamento de fosfolipídeos levando a um aumento da fluidez da membrana plasmática (HARRISON et al., 1996; COLENBRANDER et al., 2002; LUCONI et al., 2005). O deslocamento dos fosfolipídeos é dose dependente dos níveis de bicarbonato, sendo que eles podem se movimentar na ausência do bicarbonato quando há inibidores da fosfodiesterase, os quais inibem a quebra do AMPc (FLESCH; GADELLA, 2000). As trocas entre os fosfolipídeos ocorrem somente na região apical da membrana plasmática do espermatozóide sendo este fenômeno um pré-requisito para que ocorra o efluxo do colesterol (FLESCH et al., 2001).

Segundo Visconti e Kopf (1998), o papel do AMPc ainda é incerto tanto na reação acrossomal quanto na capacitação. Já foi demonstrado um aumento da atividade da proteína quinase A durante a capacitação de espermatozóides de rato. Estas mudanças observadas na atividade da proteína quinase A refletem na

elevação do AMPc intracelular. O modo de regulação do metabolismo do cAMP durante a capacitação é também de grande interesse pois esse está relacionado com as trocas de cálcio e bicarbonato. Esses íons possuem um modo de ação comum estimulando a atividade da adenilato ciclase no espermatozóide dos mamíferos.

A fosforilação das proteínas é conhecida por regular a função espermática, como motilidade e reconhecimento da zona pelúcida (TARDIF et al., 2001). 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 auxiliadores da capacitação como a proteína semelhante à albumina, o bicarbonato e o cálcio (VISCONTI; KOPF, 1998; ANDRADE, 2009).

A capacitação é acompanhada pela hiperpolarização da membrana plasmática do espermatozóide. Isto se deve, em parte, a um aumento da permeabilidade de potássio na membrana. Sabe-se pouco sobre as conseqüências dessa hiperpolarização, no entanto especula-se que tais mudanças no potencial de membrana podem recrutar canais de cálcio (VISCONTI; KOPF, 1998). Uma das mudanças resultantes desse recrutamento é a redução do colesterol da membrana plasmática (PARKS; GRAHAM, 1992; AITKEN et al., 1998).

A membrana espermática passa por grandes modificações para a fertilização (HARRISON et al., 1996; COLENBRANDER et al., 2002). As moléculas de superfície da membrana passam por reorientações e modificações quando os fatores de capacitação ativam o espermatozóide. Essas mudanças são necessárias, pois possibilitam o espermatozóide se ligar à zona pelúcida (GADELLA, 2008). A sonda lipofílica Merocianina 540 pode ser empregada para monitorar o nível de desordem dos fosfolipídeos da bicamada lipídica da membrana plasmática aumentando a intensidade de sua fluorescência com o aumento da desordem. Tal desordem é indicativa da desestabilização da membrana similar a que ocorre durante o primeiro passo da capacitação. Em estudos este corante é adicionado ao Yo-Pro 1 para a análise simultânea da integridade membrana plasmática (HARRISON et al., 1996; COLENBRANDER et al., 2002; BAUMBER; MEYERS, 2006; HALLAP et al., 2006; SARAVIA et al., 2007). A merocianina 540 possui excitação em torno de 540 nm.

2.5 HIPERMOTILIDADE

A hipermotilidade é o processo que o espermatozóide apresenta durante o trajeto no aparelho reprodutivo feminino e é descrito como um movimento espermático vigoroso e não progressivo que está relacionado ao processo de capacitação. Durante a hipermotilidade o padrão da trajetória do espermatozóide passa por grandes mudanças caracterizadas por movimentos laterais de cabeça e cauda de grande amplitude (LAMIRANDE et al., 1997; MORTIMER, 1997; HAN-CHEN HO; SUAREZ, 2001; VERSTEGEN et al., 2002; MARQUEZ; SUAREZ, 2007).

Enquanto no epidídimo o espermatozóide não possui motilidade, após a liberação o espermatozóide passa a "nadar". Esse processo é chamado de ativação da motilidade. Depois de ativado o espermatozóide possui batimentos flagelares simétrico os quais proporcionam uma trajetória linear (SUAREZ, 2008). Quando o espermatozóide se torna hiperativado a amplitude do batimento flagelar aumenta produzindo um padrão de batimentos altamente assimétrico. Isso faz com que a cabeça assuma uma trajetória helicoidal (HAN-CHEN HO; SUAREZ, 2001; SUAREZ, 2008).

Para Marquez e Suarez (2007) o aumento do pH é o elemento chave para a sinalização e controle do Ca^{2+} e isso, altera o padrão do batimento flagelar.

O papel fisiológico da hipermotilidade não está totalmente esclarecido. Estudos sugerem que a hiperativação da motilidade permite que o espermatozóide se destaque das reservas espermáticas do epitélio da tuba uterina e promova um aumento em seu impulso para penetrar no *cumulus*, facilitando dessa maneira a penetração do espermatozóide na zona pelúcida do oócito. Por essas razões imagina-se que a mensuração da hipermotilidade sirva como um marcador biológico para avaliar a capacidade funcional do espermatozóide (VERSTEGEN et al., 2002).

Para Lamirande et al. (1997) o influxo de íons bicarbonato é o que determina o desenvolvimento da motilidade hiperativada.

Em bovinos há evidências que a hiperativação é regulada separadamente da capacitação 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-AMPSc, antagonista do AMPc (MARQUEZ; SUAREZ, 2004; ANDRADE, 2009). Somando-se a estes achados, Colenbrander et al. (2001) e Andrade (2009) descreveram que a porcentagem de células hiperativas de uma determinada população com motilidade não teve mudanças quando induzidas a capacitação, concluindo que este movimento característico não pode ser usado na avaliação da capacitação.

2.6 REAÇÃO ACROSSOMAL

A ligação inicial entre espermatozóide e zona pelúcida irá iniciar a reação acrossomal resultando na liberação e ativação de suas enzimas (ALBERTS, 1994; SILVA; GADELLA, 2006; GADELLA, 2008). Esta reação é um processo de exocitose que não pode ser interrompido ou revertido uma vez que tenha sido induzida (LAMIRANDE et al., 1997).

Fatores como o influxo de cálcio, geração de espécies reativas de oxigênio, aumento na atividade da adenilato ciclase e fosforilação de proteínas estão envolvidos na indução da reação acrossomal (AITKEN et al., 1995; LAMIRANDE et al., 1997). Portanto, é possível considerar que a capacitação é um evento primário durante o qual os sistemas celulares atingem um nível específico de ativação para que aconteça a reação acrossomal (LAMIRANDE et al., 1997).

Durante a capacitação a concentração de cálcio intracelular aumenta e se mantêm constante até a indução da reação acrossomal, momento em que ocorre um segundo influxo de cálcio e fusão da membrana acrossomal externa com a membrana plasmática (LAMIRANDE et al., 1997; GADELLA et al., 2001). Liberando, deste modo, as enzimas (hialuronidase, proacrosina, esterases, fosfolipase A_2, fosfatase ácidas, aril-fosfatases, β-N-acetil glucosaminidase, aril amidase e proteínas ácidas não específicas) responsáveis pela lise da zona pelúcida (HAFEZ; HAFEZ, 2004; ANDRADE, 2009).

No instante em que o espermatozóide encontra o oócito na tuba uterina, as proteínas de membrana, presentes na superfície apical da cabeça do espermatozóide, reconhecem e ligam-se à zona pelúcida (GADELLA, 2008).

A reação acrossômica não deve ocorrer antes da ligação com a zona pelúcida pois enzimas necessárias para a penetração serão perdidas. Células espermáticas com reações acrossomais preliminares são consideradas incapazes de fertilizar o oócito (FLESCH; GADELLA, 2000).

2.7 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre em sistemas aeróbicos, ou parcialmente aeróbicos a partir dos radicais anion superóxido ($O_2^{-\bullet}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os radicais hidroxil ($OH^\bullet$), hidroperoxil ($HO_2^\bullet$), peroxil (ROO^-) e alcoxil ($RO^\bullet$), e ainda o ácido hipocloroso (HOCl) (AITKEN, 1995; GUERRA; EVANS; MAXWELL, 2004).

Atualmente existe um crescente interesse na avaliação de ROS produzidas pelos componentes celulares do sêmen, pois vem sendo demonstrado que os espermatozóides mamíferos são susceptíveis a danos causados por sua elevada produção, interferindo nas funções e na integridade de suas estruturas (GUERRA; EVANS; MAXWELL, 2004; RIVLIN et al., 2004;).

No plasma seminal existem enzimas e algumas moléculas com ação antioxidante, tais como a glutationa peroxidase, superóxido desmutase, catalase (CAT), vitamina E, vitamina C, uratos, albumina, taurina, hipotaurina, entre outras (RAPHAEL, 2007). Esses agentes controlam a produção de pró-oxidantes, como as ROS, prevenindo possíveis danos celulares. Porém, na presença de um grande número de células inflamatórias e espermatozóides defeituosos, ou em procedimentos que diminuam acentuadamente a quantidade de plasma seminal, há um aumento na produção de ROS (BAUMBER et al., 2000; AITKEN, 2004; RAPHAEL, 2007).

A produção de espécies reativas de oxigênio faz parte do funcionamento normal da célula espermática, uma vez que baixas concentrações de ROS estão envolvidas com a hiperativação dos espermatozóides, sendo sua produção um pré-requisito para capacitação espermática, além de estar relacionada à ligação com a

zona pelúcida e fusão do espermatozóide com o oócito (BROUWERS; GADELLA, 2003; RAPHAEL, 2007).

Porém, a produção excessiva de ROS determina o estresse oxidativo, que causa disfunções na própria célula espermática através de diferentes mecanismos, como a peroxidação dos lipídeos da membrana plasmática, inibição do metabolismo, da motilidade e da capacidade fecundante (GUERRA; EVANS; MAXWELL, 2004; RAPHAEL, 2007). De acordo com Aitken (1997), acredita-se que os principais alvos de ataque de ROS são os lipídeos encontrados nas membranas plasmática, acrossomal e da gota citoplasmática.

Na presença de ROS o processo de peroxidação lipídica inicia-se e ao ter contato com os ácidos decosahexaenóicos da membrana espermática, retiram um hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, que por sua vez irá agir em outro ácido decosahexaenóico. Este processo desencadeia a cascata de peroxidação, causando alterações estruturais na membrana plasmática, com perda de fluidez e da capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático, mudanças no metabolismo celular e, por fim, perda da capacidade de fertilização do espermatozóide (MARQUES et al., 2002; RAPHAEL, 2007).

A peroxidação lipídica pode ser quantificada e localizada após a coloração espermática com a sonda C11-BODIPY$^{581/591}$ a qual é um análogo de ácidos graxos poliinsaturados que é o principal alvo das espécies reativas de oxigênio (SILVA; GADELLA, 2006).

A sonda C11-BODIPY$^{581/591}$ muda sua propriedade de fluorescência após a peroxidação, quando intacta esta emite fluorescência vermelha, com comprimento de onda de 580 a 620 nm, porém torna-se verde quando sofre peroxidação pelas espécies reativas de oxigênio, cujo comprimento de onda é 495 a 545 nm, e laranja com peroxidação pelo peroxinitrito. A alteração da emissão de fluorescência para verde ou laranja indica a presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na parte hidrofóbica da bicamada lipídica das membranas espermáticas (BROUWERS; GADELLA, 2003; SILVA; GADELLA, 2006).

Estudos com espermatozóides bovinos, suínos e eqüinos demonstraram que a peroxidação lipídica ocorre principalmente na peça intermediária, em menor proporção na parte posterior da cauda e praticamente ausente na cabeça do

espermatozóide (BROUWERS; GADELLA, 2003; RAPHAEL, 2007). O grau de peroxidação da sonda pode ser avaliado pela citometria de fluxo ou pela microscopia a laser confocal (SILVA; GADELLA, 2006).

2.8 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

Para Amann e Pickett (1987) e Celeghini et al. (2008) a criopreservação do sêmen depende da manutenção do potencial fertilizante dos espermatozóides. O processo de criopreservação pode causar mudanças na morfologia espermática, incluindo danos ao acrossomo, mitocôndrias e cauda. A maioria das células espermáticas perde a sua integridade e funcionalidade quando submetidas à criopreservação (HOLT, 2000; CELEGHINI et al., 2008).

As evidências sugerem que os processos responsáveis pelos danos celulares causados pela congelação são: a formação de gelo intracelular e a desidratação osmótica das células resultante da formação de gelo extracelular (STRAUSS; INGENITO, 1980). A preservação das estruturas espermáticas após criopreservação é obtida por uma interação entre diluidor, crioprotetor, curvas de refrigeração, congelação e descongelação, na tentativa de minimizar os efeitos deletérios (AMANN; PICKETT, 1987).

Alterações resultantes do processo de criopreservação têm sido relatadas e incluem: diminuição de proteínas da membrana plasmática e do plasma seminal, redução da estabilidade do DNA e da habilidade do espermatozóide de interagir com o epitélio da tuba uterina (PONS-REJRAJI et al., 2009).

A redução da fertilidade do sêmen congelado é atribuída à alteração da estrutura e função da membrana durante a refrigeração, congelação e descongelação. A natureza dos danos da membrana plasmática em temperaturas reduzidas ainda não é clara, porém evidências sugerem que ela é comprometida por uma reorganização de seus lipídeos (PARKS; GRAHAM, 1992).

Para Stradaioli et al. (2007) e Pons-Rejraji et al. (2009), o choque térmico e os danos causados pela congelação estão associados com as espécies reativas de oxigênio e com o desencadeamento do estresse oxidativo.

Uma melhora no processo de congelação pode ser obtida pelo uso de diferentes diluidores, que interagem com o sêmen e fornecem maior proteção aos vários compartimentos celulares durante a refrigeração, congelação e descongelação (HOLT, 2000; CELEGHINI et al., 2008).

2.8.1 CRIOPROTETORES

Os componentes básicos dos diluidores são substâncias energéticas, crioprotetores, soluções tampões e antibióticos. Sua constituição deve garantir nutrição, proteção, balanço eletrolítico (pH e osmolaridade) e inibição bacteriana (GRAHAM, 1995; SQUIRES et al., 1999; HOLT, 2000).

A maioria das células necessita da presença de um ou mais agentes protetores para sobreviverem ao processo de criopreservação. Estes agentes são chamados de crioprotetores e divididos em intracelulares (penetrantes) e extracelulares (não penetrantes) (CELEGHINI, 2005).

É importante ressaltar que embora os crioprotetores sejam fundamentais para a sobrevivência dos espermatozóides no processo de congelação, eles podem exercer efeitos tóxicos aos espermatozóides e com isso diminuir as taxas de fertilidade (HAMMERSTEDT et.al., 1990).

Os crioprotetores intracelulares são moléculas pequenas que atravessam a membrana plasmática e atuam nos meios intra e extracelulares, agem como solvente e soluto e contribuem com a pressão osmótica intra e extracelular (GRAHAM, 1995). Os crioprotetores intracelulares possuem estruturas que promovem a ligação do hidrogênio com moléculas de água. Esta ligação altera a orientação das moléculas de água nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células (DALIMATA; GRAHAM, 1997).

Até o momento, o glicerol é o crioprotetor intracelular que apresenta melhores resultados na preservação do sêmen bovino (GRAHAM, 1995).

O exato mecanismo de ação do glicerol ainda não é completamente entendido, porém está claro que ele penetra na membrana plasmática e age no interior da célula (PARKS; GRAHAM, 1992). Para Mazur (1977) e Pickett (1986) o

glicerol possui a capacidade de causar mudanças no tamanho e forma dos cristais de gelo, diminuindo o seu potencial mecânico de lesão celular.

Segundo Graham (1995), há evidências de que o glicerol é tóxico ao espermatozóide e parte de sua toxicidade é devida a injúrias bioquímicas resultantes da ação direta do crioprotetor sobre os componentes celulares.

Os crioprotetores extracelulares são moléculas grandes que não conseguem atravessar a membrana plasmática, como proteínas, açúcares, polímeros sintéticos. Atuam no meio extracelular, ou seja, agem como solutos ou colóides (GRAHAM, 1995). Protegem através de efeitos osmóticos, promovendo um meio hipertônico que induz a saída de água das células, levam à desidratação dos espermatozóides e reduzem a probabilidade de formar cristais de gelo no interior das células (AMMAN; PICKETT, 1987).

A gema de ovo é um crioprotetor extracelular que quando presente em meios diluentes permite uma redução da concentração de glicerol (WATSON, 1990). Apesar do uso, por mais de 60 anos, de diluidores contendo gema de ovo, seus mecanismos de proteção do espermatozóide contra os danos causados pelo armazenamento, refrigeração e congelação ainda não são totalmente compreendidos (BERGERON et al., 2004).

Para Watson (1995) a gema de ovo é o agente protetor do espermatozóide mais efetivo contra o choque térmico. Previne o dobramento da cauda dos espermatozóides e protege a motilidade espermática, essa proteção deve-se aos lipídeos presentes na gema de ovo, os quais são os principais responsáveis pela ação protetora sobre a membrana plasmática.

Há muitas tentativas para encontrar o componente protetor da gema de ovo com o intuito de desenvolver um diluidor “quimicamente definido” e desta forma, diminuir a possibilidade de transmissão de patógenos. Recentes estudos sugerem que dentre os componentes da gema de ovo aqueles que possuem ação crioprotetora são a fosfatidilcolina (lecitina), os fosfolipídios e as lipoproteínas. Existe um consenso entre estes estudos de que a lecitina forneça uma proteção ao espermatozóide durante o choque frio e a congelação. Porém, um dos principais problemas da lecitina é que esta é insolúvel em soluções aquosas, formando desta maneira, suspensões instáveis (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

A fração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) é o principal componente da gema de ovo, 2/3 do total sólido localizado na fração solúvel da gema, que oferece proteção ao espermatozóide. Essa proteção é resultado da ligação do LDL com a membrana plasmática do espermatozóide estabilizando-a durante as zonas críticas de temperatura onde a porção lipídica atua como um isolante térmico (GRAHAM; FOOTE, 1987; TRIMECHE et al., 1996; VISHWANATH; SHANNON, 2000; MOUSSA et al., 2002). Quinn et al. (1980) sugeriram que os fosfolipídios podem formar um filme ou camada protetora na superfície da membrana dos espermatozóides.

A preparação e composição do diluidor influenciam tanto na qualidade do sêmen quanto na contaminação. O uso de gema de ovo não pasteurizada favorece o risco de contaminação microbiana, portanto um substituto de origem não animal livre de patógenos seria obviamente preferível (WAGTENDONK-DELEEUW et al., 2000; AIRES et al., 2003). Além disso, a presença de algumas substâncias na gema que inibem a respiração do espermatozóide ou reduzem sua motilidade aumenta a necessidade da substituição da gema de ovo (PACE; GRAHAM[1], 1974 apud AMIRAT et al., 2004, p. 1145). Além do risco de contaminação microbiana, a gema de ovo possui grande variabilidade de sua composição tornando difícil a análise dos efeitos benéficos nos componentes do sêmen criopreservado. Somando-se a isso, diversos países têm o receio da introdução de doenças exóticas pelo transporte de produtos a base de ovo e leite (THUN et al., 2002; AIRES et al., 2003).

Uma alternativa são os diluidores a base de lecitina de soja (fosfatidilcolina) que têm apresentado bons resultados, e já são utilizados comercialmente. Pelo fato desses diluidores não possuírem gema de ovo eles possuem algumas vantagens na manipulação laboratorial e não fornecem riscos de contaminação biológica. O uso desses diluidores promove mudanças notáveis na motilidade do espermatozóide criopreservado. Estas mudanças podem ser resultado da diferença de viscosidade entre os dois tipos de diluidores, mas também pode ser um efeito de conservação (NEHRING; ROTHE, 2003).

[1] PACE, M. M.; GRAHAM, E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**, v. 39, p. 1144-1149, 1974.

2.9 MUDANÇAS SEMELHANTES À CAPACITAÇÃO (CRIOCAPACITAÇÃO)

Como conseqüência da criopreservação tem sido observado que após a descongelação uma parte dos espermatozóides apresenta características similares a da capacitação *in natura*. Uma vez que o espermatozóide capacitado ou com o acrossomo reagido possui uma reduzida expectativa de vida, a criopreservação pode comprometer a fertilidade (BAILEY et al., 2000; PONS-REJRAJI et al., 2009).

Perez et al. (1996) utilizando a sonda fluorescente clortetraciclina mostrou que o sêmen criopreservado de carneiro capacitou mais rapidamente do que o sêmen *in natura*. Corroborando este estudo, Cormier et al. (1997) confirmaram essa criocapacitação observando a habilidade do espermatozóide de fertilizar oócitos *in vitro* sem um tratamento prévio de capacitação que normalmente é necessário para espermatozóides não congelados.

O mecanismo pelo qual a criocapacitação ocorre não é completamente compreendido e torna-se ainda mais difícil de ser elucidado, pois o início da capacitação ainda não é claro. A capacitação do espermatozóide mamífero é associada com a reorganização da membrana plasmática devido à redistribuição dos fosfolipídios e retirada do colesterol. A criopreservação induz esses eventos associados à capacitação que favorecem o influxo de cálcio (BAILEY et al., 2000; HALLAP et al., 2006).

Conhecimentos sobre os processos que resultam na capacitação prematura e de seus mecanismos para prevenir ou atrasar estas mudanças no espermatozóide durante a criopreservação são imprescindíveis para a obtenção de uma boa taxa de fertilidade (ANDRADE, 2009).

3 Objetivo

3 OBJETIVO

O experimento foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos de três diluidores diferentes sobre a motilidade, hiperativação espermática, reação acrossomal, capacitação e peroxidação lipídica das membranas de espermatozóides criopreservados de bovinos.

4 Hipótese

4 HIPÓTESE

Diluidores com formulações distintas, durante o processo de congelação do sêmen bovino, atuam de forma diferente nas alterações do padrão da motilidade que se assemelham a hiperativação, mudanças semelhantes às ocorridas no evento da capacitação (criocapacitação) e peroxidação lipídica.

5 Material e Métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção estão descritas as metodologias utilizadas neste experimento, bem como, o local e período experimental, manejo dos touros, colheita, congelação e avaliações do sêmen *in natura* e pós-descongelação.

5.1 LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL

As atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Biotecnologias 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 maio de 2009.

5.2 ANIMAIS E MANEJO

Para a realização deste experimento foram utilizados 10 touros puros da raça Nelore com idades de aproximadamente 26±2 meses, mantidos sob as mesmas condições ambientais, ou seja, em pastagem de capim Braquiária (*Brachiaria decumbens,* Stapf), com água e sal mineral *ad libitum*. Foi realizado o controle de endo e ectoparasitas regularmente e os animais foram pesados quinzenalmente.

5.3 COLHEITA DO SÊMEN

Foram realizadas seis colheitas de sêmen de cada animal em intervalos quinzenais, por eletroejaculação. Para evitar possíveis contaminações do sêmen durante as colheitas, foi realizada criteriosamente, antes de cada colheita, a higienização do prepúcio, externamente foi limpo com água e sabão neutro e internamente com solução fisiológica.

5.4 AVALIAÇÕES DO SÊMEN *IN NATURA*

Para a colheita e avaliação seminal todos os materiais utilizados foram mantidos aquecidos à temperatura de 37°C. Logo após a colheita, cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor e alterações morfológicas.

O volume foi averiguado pela leitura direta do tubo de colheita graduado. A concentração foi realizada diluindo o sêmen na proporção de 1:100 em formol salino tamponado e as células contadas em câmara de Neubauer sob microscopia óptica com aumento de 400x. A motilidade foi avaliada pelo sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA) e as alterações morfológicas foram realizadas pela técnica da câmara úmida sob microscopia de contraste de interferência diferencial com aumento de 1000x.

Essas avaliações foram realizadas, pois somente o sêmen que correspondiam aos valores estabelecidos, para o sêmen bovino, pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal foi utilizado neste experimento, como motilidade total maior ou igual a 70% e alterações morfológicas menores que 30% no total.

5.5 DILUIÇÃO E PREPARO DO SÊMEN

Este experimento foi delineado com o objetivo de comparar o efeito de três diluidores diferentes. Para isso, cada ejaculado foi dividido em três tratamentos, sendo cada um diluído em meios crioprotetores distintos. A primeira fração do ejaculado foi diluída no meio Botu-Bov® (diluidor 1), meio este à base de gema de ovo; a segunda fração diluída no meio à base de lecitina de soja Botu-Bov® (diluidor 2) e a terceira fração em meio AndroMed® (diluidor 3) também à base de lecitina de soja (Figura 1).

Dos diluidores utilizados dois são comerciais e um em fase de testes. Os diluidores Botu-Bov® (1) a base de gema de ovo e o Botu-Bov® (2) a base de lecitina de soja foram fabricados pela empresa Biotech-Botucatu-Ltda/ME. A composição química básica do diluidor 1 é de açúcares, aminoácidos, soluções tampão, OEP (*ovus est past*) e gema de ovo. Já o diluidor AndroMed® (diluidor 3) é comercializado pela empresa Mini-tüb e sua composição básica é composta por fosfolipídios, TRIS, ácido cítrico, açúcares, antioxidantes, glicerol, água e antibióticos.

Para os três tratamentos o sêmen foi diluído na concentração de 50 milhões de espermatozóides por mL. Após a diluição foram homogeneizados e envasados em 10 palhetas francesas de 0,5 mL (IMV International, St. Paul, MN, USA), as quais foram identificadas com o nome do touro, a partida do ejaculado e o diluidor utilizado.

5.6 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

Para a criopreservação do sêmen foi utilizado o aparelho portátil da marca TETAKON, TK 3000®(TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Minas Gerais, Brasil), composto por um aparelho programável, equipado com um porta-palhetas, um tubo de refrigeração e uma caixa térmica para nitrogênio líquido. Para a refrigeração, as palhetas foram colocadas no porta-palhetas, acondicionado no tubo de refrigeração, seguindo uma curva de -0,25ºC/minuto, até alcançar a temperatura

de 5 ºC, com duração aproximada de uma hora e 15 minutos. Em seguida, o porta-palhetas foi colocado na caixa térmica contendo nitrogênio líquido e a curva de congelação seguida foi de -20ºC/minuto até atingir -120ºC. A duração média da curva de congelação foi de sete minutos, quando as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196ºC). Após esse processo as palhetas foram condicionadas em racks e armazenadas em botijões criogênicos.

5.7 AVALIAÇÃO DO SÊMEN PÓS-CRIOPRESERVAÇÃO

Duas palhetas de sêmen de cada tratamento de uma mesma partida foram descongeladas (37°C por 30 segundos), o sêmen foi colocado em tubos de microcentrifugação, homogeneizado e avaliado quanto as características da motilidade e detecção da população hiperativa pelo sistema computadorizado (CASA), avaliação da reação acrossomal, peroxidação lipídica e estabilidade da membrana plasmática (Figura 1).

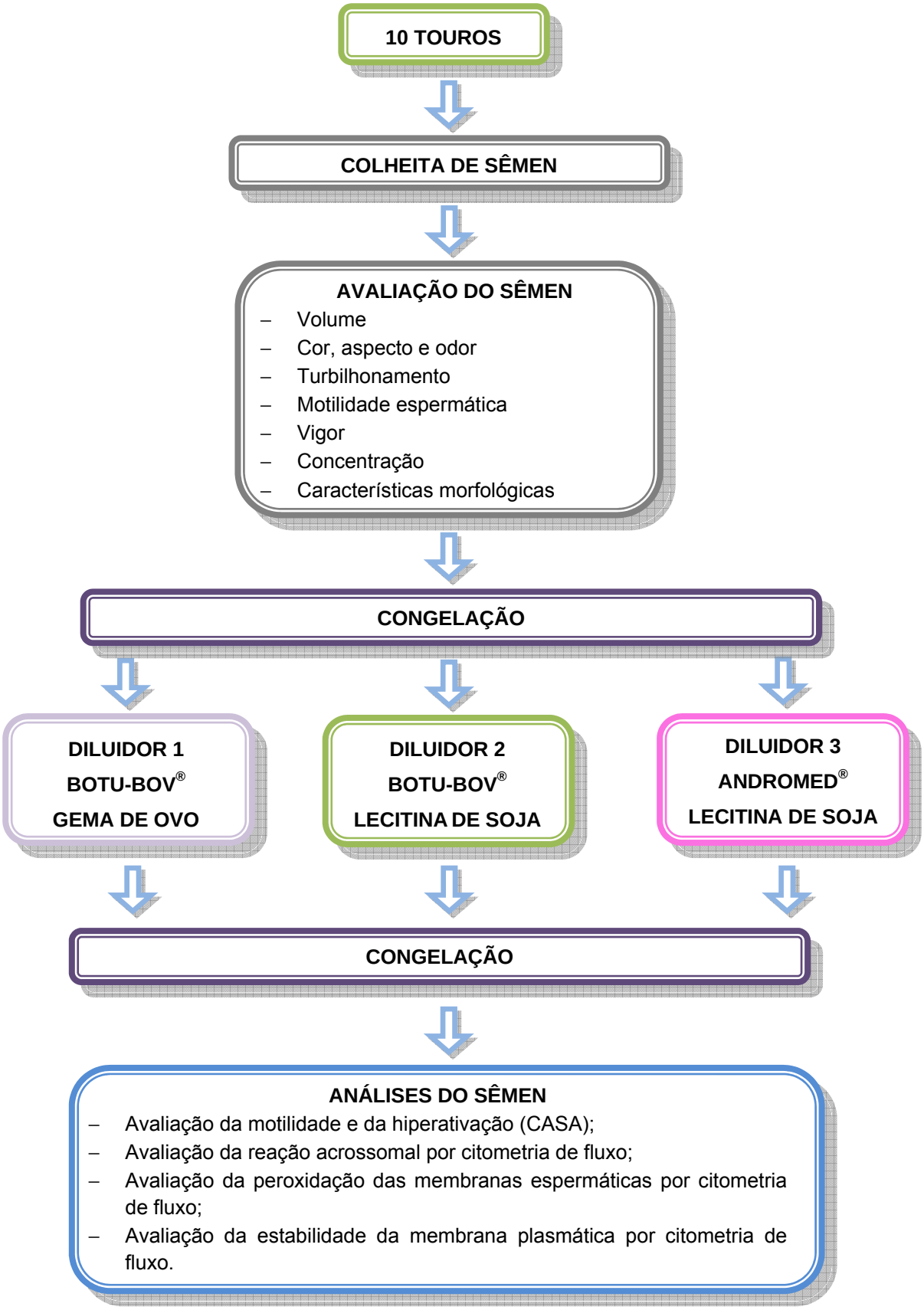


Figura 1 - Esquema Experimental

5.8 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DAS CARACTERÍSTICAS DA MOTILIDADE E HIPERATIVAÇÃO ESPERMÁTICA

Com o intuito de comparar o padrão de motilidade dos espermatozóides nos diferentes tratamentos, as amostras foram examinadas pelo sistema de análise computadorizado do sêmen (CASA) utilizando o aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser (HTM-IVOS, Versão 12.3, Hamilton Thorne Research, Beverly, Massachusetts, USA), para a análise do movimento espermático utilizou-se o programa *Animal Motility*, onde previamente foi ajustado (setup) para a análise de sêmen bovino (Anexo A).

Para a análise foi utilizada a câmara de Makler, na qual foi colocado 10µL do sêmen e realizada escolha manual do campo de leitura e análise, sendo selecionados no mínimo cinco campos por amostra. Os parâmetros da motilidade espermática gerados pelo sistema foram motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilinear (VCL, µm/s), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), freqüência 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 células hiperativas na amostra. Como parâmetro para essa avaliação foram utilizados os dados fornecidos por Mortimer (1997), no qual o espermatozóide foi considerado hiperativado quando possuía VCL≥180, LIN≤45, ALH max>10. Na figura 2 estão apresentados os valores, a trajetória e o deslocamento da cabeça de um espermatozóide considerado hiperativado (Exemplo de um espermatozóide hiperativado “Tela” do programa Edit/Sort na Figura 2).

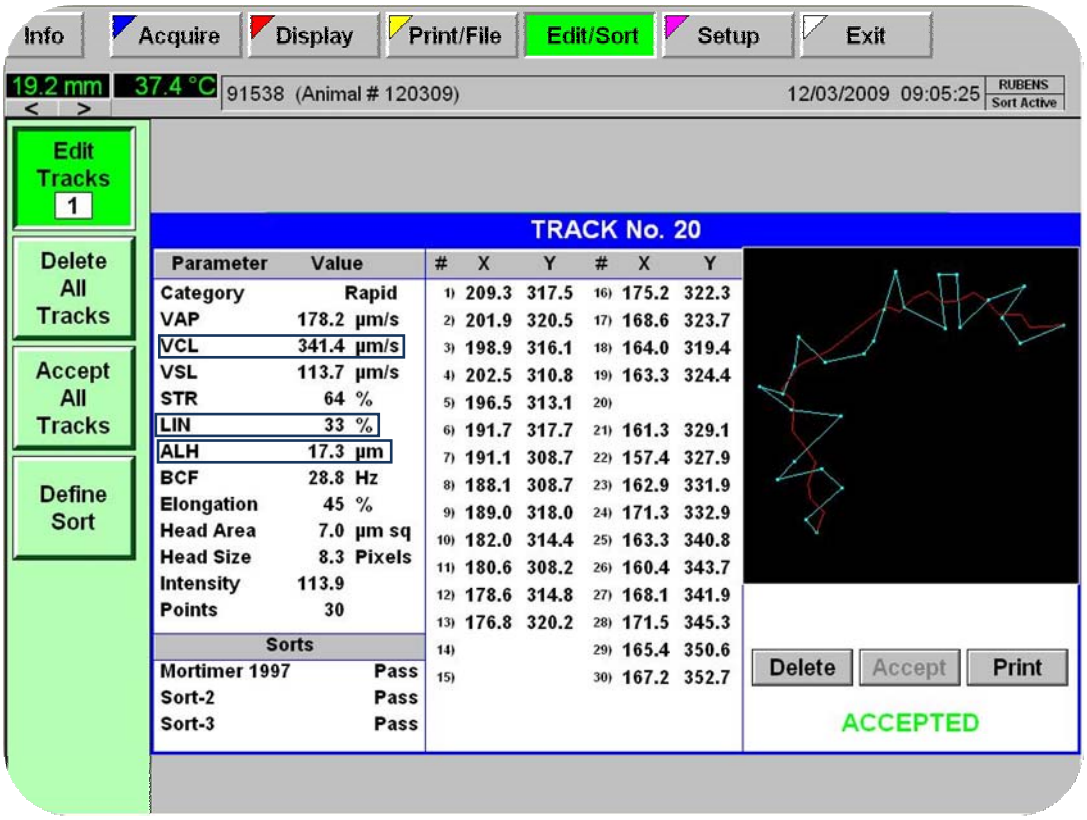


Figura 2 - Programa Edit/Sort do aparelho HTM-IVOS, versão 12.3, Hamilton Thorne Research, Beverly, Massachusetts, USA - Pirassununga – 2009

5.9 AVALIAÇÃO DA REAÇÃO ACROSSOMAL E INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a avaliação da reação acrossomal pela citometria de fluxo foi retirada uma alíquota de cada amostra e adicionada ao TALP *sperm* modificado (Anexo 02) em tubos de microcentrifugação previamente aquecidos (37°C), obtendo a concentração de 5×10^6 espermatozóides/mL, no volume final de 148µL. Em seguida, foram colocados 2µL de Hoechst 33342 (H33342; 40 µg/mL, H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e deixado por 10 minutos incubando 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 presentes nos diferentes diluidores. Passado o período de incubação, foram adicionados a amostra 3 µL de Iodeto de Propídio (PI-0,5 mg/mL, 287075, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri,

EUA), conjuntamente com a adição de 10 µL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA-100 µg/mL, L-0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA). Após 10 minutos de incubação a 37°C, os espermatozóides foram diluídos com a adição de 150 µL de TALPm e transferidos para tubos graduados de 15 mL (37°C). As amostras passaram a ter uma concentração de 2,5 x 10^6 espermatozóides/mL no momento de serem analisadas pela técnica de citometria de fluxo (aparelho FACSaria, Beckton-Dickeson®). Todas as amostras tiveram 10.000 células analisadas (Figura 3).

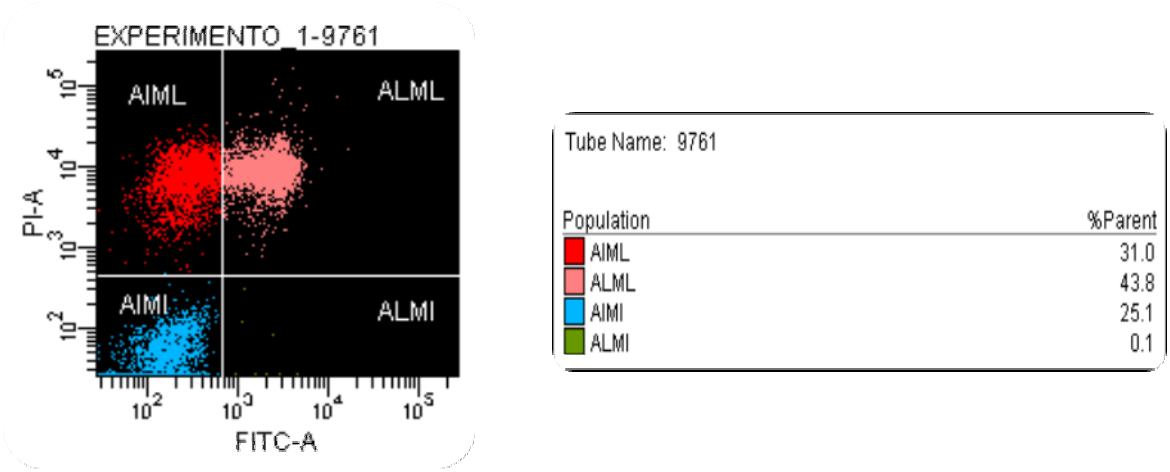
As amostras foram classificadas em quatro categorias:

AIML – Membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida.

ALML – Membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida.

AIMI – Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida.

ALMI – Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida.



AIML – Membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida.
ALML – Membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida.
AIMI – Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida.
ALMI – Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida.

Figura 3 - Gráfico de pontos gerados pela análise por citometria de fluxo. Amostra corada com a associação H33342, IP e FITC-PSA, permitindo a classificação dos espermatozóides bovinos em quatro categorias - Pirassununga - SP

5.10 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

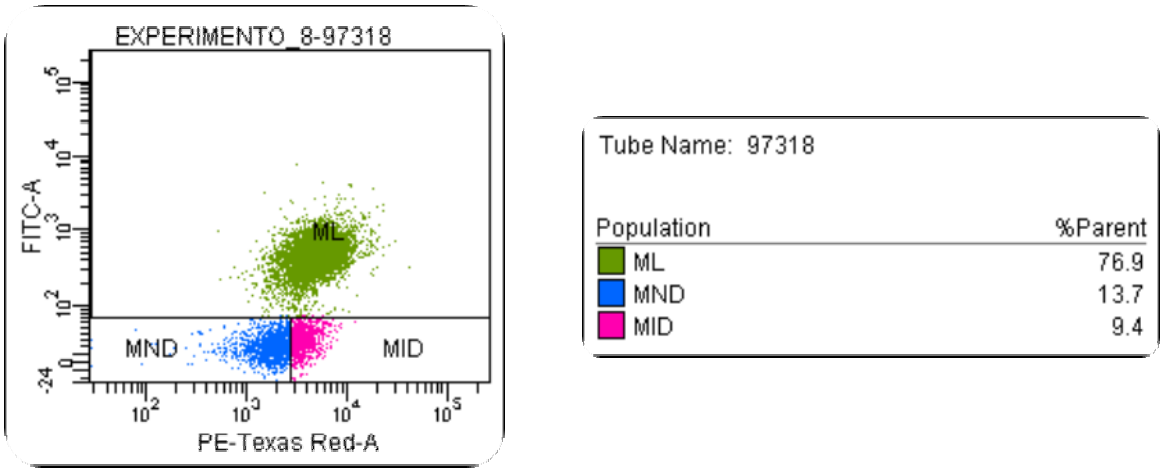
Para a análise da estabilidade da membrana plasmática pela técnica de citometria de fluxo, as amostras foram diluídas em TALPm na concentração de 5 x 10^6 espermatozóides/mL em um volume final de 147 µL. Foram adicionados 2 µL de H33342 (40 µg/mL, H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e incubado por 10 minutos (37°C). Em seguida, 0,5 µL da sonda fluorescente Yo-Pro-1 (7,5 µM-Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) foi adicionado à amostra obtendo-se uma concentração final de 25 nM. Então, a amostra foi incubada por 20 minutos para posteriormente ser adicionada a 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. A coloração com Merocianina 540 identificou 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) (Figura 4).

As amostras foram classificadas em três categorias:

ML – Membrana plasmática lesada.

MND – Espermatozóide com membrana plasmática íntegra organizada.

MID – Espermatozóide com a membrana plasmática íntegra desorganizada.



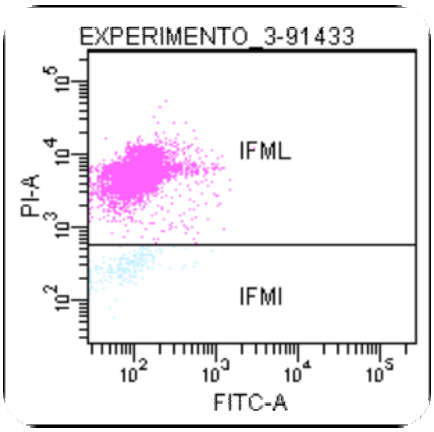
ML – Membrana plasmática lesada.
MND – Espermatozóide com membrana plasmática íntegra organizada.
MID – Espermatozóide com a membrana plasmática íntegra desorganizada.

Figura 4 - Gráfico de pontos gerados pela análise por citometria de fluxo. Amostra corada com a associação H33342, Yo-Pro e Merocianina, permitindo a classificação dos espermatozóides bovinos em três categorias – Pirassununga - 2009

5.11 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO DA MEMBRANA ESPERMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Uma alíquota de cada amostra de foi retirada e adicionada ao TALP *sperm* modificado (Anexo B) em tubos de microcentrifugação previamente aquecidos (37°C), obtendo concentração de 5 x 10^6 espermatozóides/mL e com um volume final de 499,5µL. Estas foram coradas com 0,5 µL da sonda C11-BODIPY$^{581/591}$(1 mg/mL, D-3861, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) por 30 minutos a 37°C. Passada a incubação, foram transferidos 145 µL desta solução para outro microtubo e adicionado 2 µL de H33342 (40 µg/mL, H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) sendo incubado novamente por 10 minutos a 37°C. Em seguida, adicionou-se 3 µL de PI (0,5 mg/mL, 287075, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) servindo como um marcador das células com membrana plasmática lesada. Após 5 minutos de incubação a 37°C, os espermatozóides 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 x 10^6

espermatozóides por mL no momento de serem analisadas por citometria de fluxo. Foram analisadas 10.000 células por amostra. As células viáveis (IP negativo) e coradas com a sonda C11-BODIPY foram analisadas quanto à mediana da intensidade da emissão de fluorescência captada no fotomultiplicador com *long pass* de 502 e *band pass* de 530 ±15 nm (Figura 5).



Tube Name: 91433

Population	%Parent	FITC-A Mean	FITC-A Median
IFPER	99.8	117	102
IFMI	2.3	95	79
IFML	97.7	117	103

IFPER – Intensidade de emissão de fluorescência da amostra peroxidada.
IFMI - Intensidade de emissão de fluorescência do sêmen peroxidado com membrana plasmática íntegra.
IFML - Intensidade de emissão de fluorescência do sêmen peroxidado com membrana plasmática lesada.

Figura 5 - Gráfico de pontos gerados pela análise por citometria de fluxo. Amostra corada com a associação H33342, C11-BODIPY e IP, permitindo a classificação dos espermatozóides bovinos em três categorias – Pirassununga – SP

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS, 1998), com prévia verificação da normalidade dos resíduos. As variáveis dependentes que não atenderam às premissas estatísticas foram transformadas em arco-seno. Os efeitos de touro, diluidor e suas respectivas interações foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA). Quando o principal efeito foi significativo, as médias foram

comparadas pelo teste de Fisher (LSD). As hipóteses testadas foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

O quadro de análise de variância está apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Quadro de análise de variância para delineamento com nove blocos e três tratamentos - Pirassununga-SP – 2009

Fonte de Variação	**Grau de Liberdade**
Tratamento	2
Touro (Bloco)	9
Resíduo	168
Total	179

6 Resultados

6 RESULTADOS

Nesta seção encontram-se os resultados obtidos nos três diferentes tratamentos propostos para este experimento.

6.1 EFEITOS DOS DIFERENTES DILUIDORES NAS CARACTERÍSTICAS DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO (CASA)

Os valores médios, erros padrão e as diferenças estatísticas, de cada variável avaliada pelo CASA nos diluidores estudados estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 – Médias ± erros padrão das características do movimento espermático (CASA) do sêmen bovino após descongelação nos três diferentes tratamentos – Pirassununga - 2009

Parâmetros	**Diluidores**		
	D - 1	D - 2	D - 3
Motilidade total (%)	42,41 ± 2,04[a]	20,08 ± 1,51[b]	19,90 ± 1,20[b]
Motilidade progressiva (%)	36,27 ± 1,77[a]	17,47 ± 1,27[b]	16,06 ± 1,06[b]
Células Rápidas (%)	39,23 ± 1,98[a]	18,48 ± 1,39[b]	18,36 ± 1,13[b]
Células Hiperativas (%)	6,66 ± 0,67[b]	6,61 ± 0,73[b]	12,50 ± 1,02[a]
Velocidade de trajeto (VAP μm/s)	81,10 ± 1,51[b]	78,14 ± 1,87[b]	89,65 ± 2,11[a]
Velocidade progressiva (VSL μm/s)	69,23 ± 1,08[a]	67,88 ± 1,40[a]	70,31 ± 1,20[a]
Velocidade curvilinear (VCL μm/s)	133,29 ± 3,40[b]	128,96 ± 3,95[b]	163,53 ± 4,90[a]
Amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH μm)	5,57 ± 0,15[b]	5,33 ± 0,17[b]	6,77 ± 0,19[a]
Frequência de batimentos (BCF Hz)	28,25 ± 0,62[b]	30,34 ± 0,62[a]	30,11 ± 0,40[a]
Retilinearidade (STR %)	86,43 ± 0,51[b]	88,44 ± 0,51[a]	81,09 ± 0,72[c]
Linearidade (LIN %)	56,61 ± 0,78[a]	57,53 ± 0,81[a]	48,26 ± 0,86[b]

Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística ($p<0,05$).
D - 1 – Diluidor Botu-Bov®, a base de gema de ovo.
D - 2 – Diluidor Botu-Bov®, a base de lecitina de soja.
D - 3 – Diluidor AndroMed®, a base de lecitina de soja.

A motilidade total e progressiva foi melhor preservada no diluidor 1 Botu-Bov®, diferindo estatisticamente ($p<0,05$) dos demais diluidores. Já, entre os diluidores 2 e 3, a base de lecitina de soja, não foram encontradas diferenças significativas.

A porcentagem de células consideradas hiperativas foi estatisticamente maior no diluidor 3 AndroMed®, não diferindo nos demais diluidores.

A porcentagem de células rápidas foi maior no diluidor 1, Botu-Bov® ($p<0,05$). Já entre os diluidores 2 e 3, a base de lecitina de soja, não foram encontradas diferenças.

As velocidades espermáticas avaliadas pelo CASA, velocidade de trajeto (VAP), velocidade curvilinear (VCL) foram maiores no diluidor 3 AndroMed®, ($p<0,05$), porém nos diluidores 1 e 2 as médias foram estatisticamente iguais. Quanto ao VSL não houve diferença entre os diluidores.

O deslocamento lateral de cabeça (ALH) foi maior no diluidor 3 AndroMed® ($p<0,05$) quando comparado com os demais diluidores.

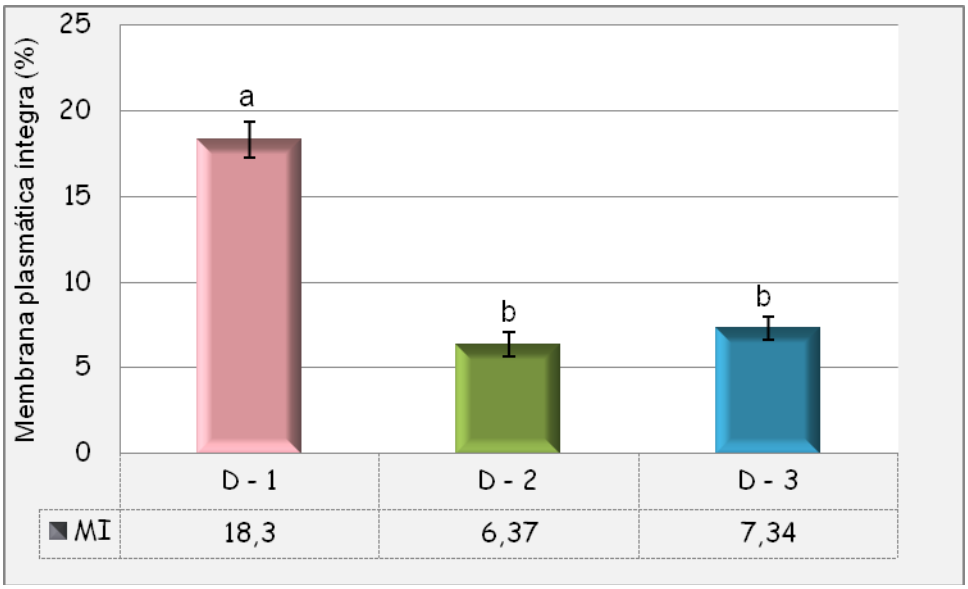
A freqüência de batimento (BCF) foi menor no diluidor 1 Botu-Bov®, sendo estatisticamente diferente dos outros dois diluidores.

O valor da média da retilinearidade (STR) foi diferente ($p<0,05$) entre os três diluidores estudados.

Já a linearidade (LIN) foi menor no diluidor 3 AndroMed®, e não diferiu nos outros dois diluidores.

6.2 EFEITOS DOS DIFERENTES DILUIDORES SOBRE A REAÇÃO ACROSSOMAL E MEMBRANA PLASMÁTICA

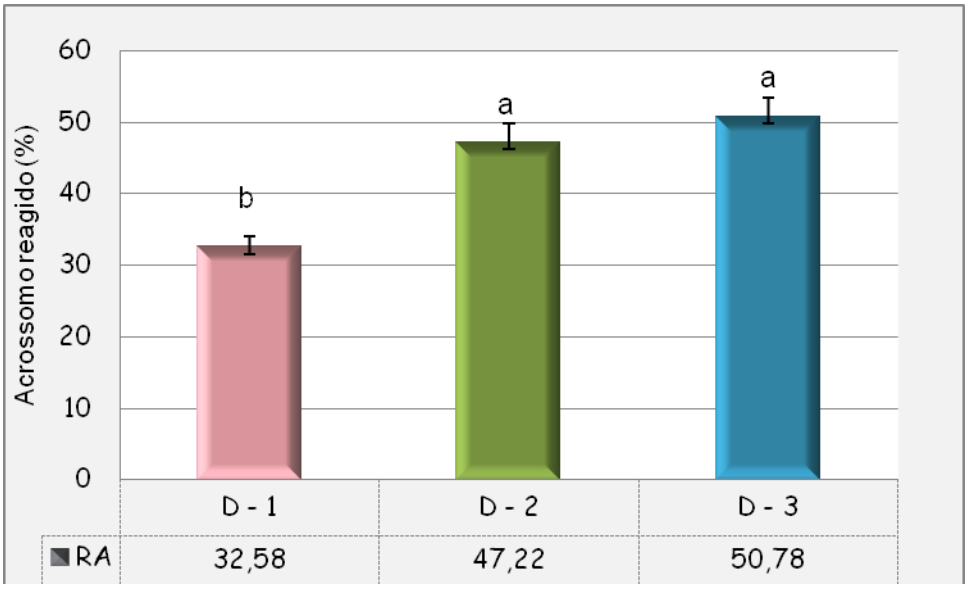
Após a descongelação da amostra, avaliada pela associação das sondas H33342, IP e FITC-PSA, foi notado uma diferença significativa ($P<0,05$) na porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra no sêmen congelado. O diluidor 1 Botu-Bov®, foi o que melhor preservou a integridade da membrana plasmática (Gráfico 1).



D - 1 – Diluidor Botu-Bov®, a base de gema de ovo.
D - 2 – Diluidor Botu-Bov®, a base de lecitina de soja.
D - 3 – Diluidor AndroMed®, a base de lecitina de soja.

Gráfico 1 - Médias ±erros padrão da quantidade de células espermáticas (%), após descongelação, com membrana plasmática íntegra nos três tratamentos diferentes – Pirassununga - 2009

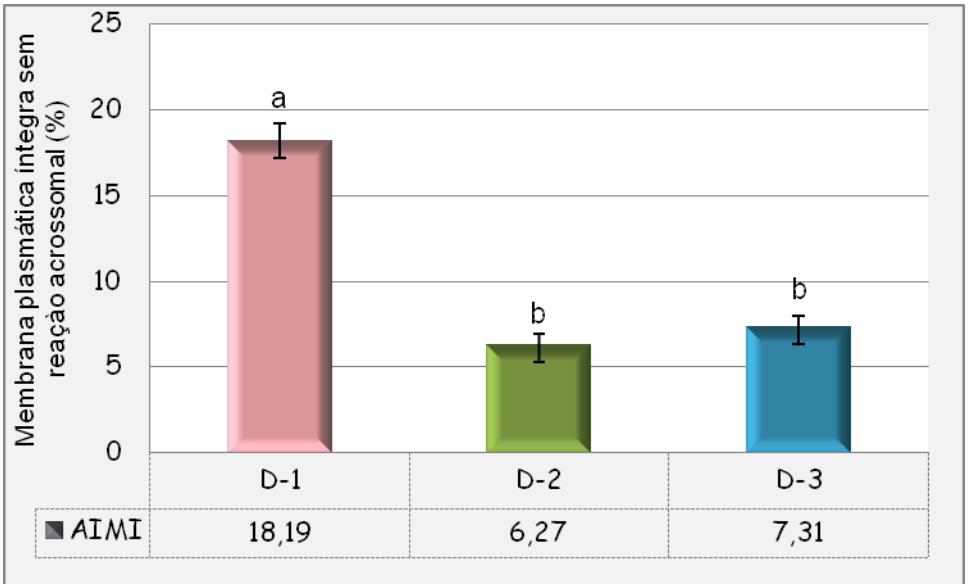
Foi observado que o diluidor 1 preservou melhor o acrossomo ($p<0,05$), porém entre os demais tratamentos (diluidor 2 e 3) não houve diferença estatística, sendo numericamente maior a reação acrossomal no diluidor 3 AndroMed® (Gráfico 2).



D - 1 – Diluidor Botu-Bov®, a base de gema de ovo.
D - 2 – Diluidor Botu-Bov®, a base de lecitina de soja.
D - 3 – Diluidor AndroMed®, a base de lecitina de soja.

Gráfico 2 - Médias ± erros padrão da quantidade de células espermáticas (%), após descongelação, com reação acrossomal, nos três diferentes tratamentos – Pirassununga - 2009

Foi observado que no diluidor 1 Botu-Bov®, a porcentagem de células sem reação acrossomal e com a membrana plasmática íntegra foi maior ($p<0,05$), porém não foi encontrada diferença entre os diluidores 2 e 3 (Gráfico 3). O diluidor 2 Botu-Bov®-lecitina de soja obteve numericamente o menor valor de células dessa categoria (6,27%).



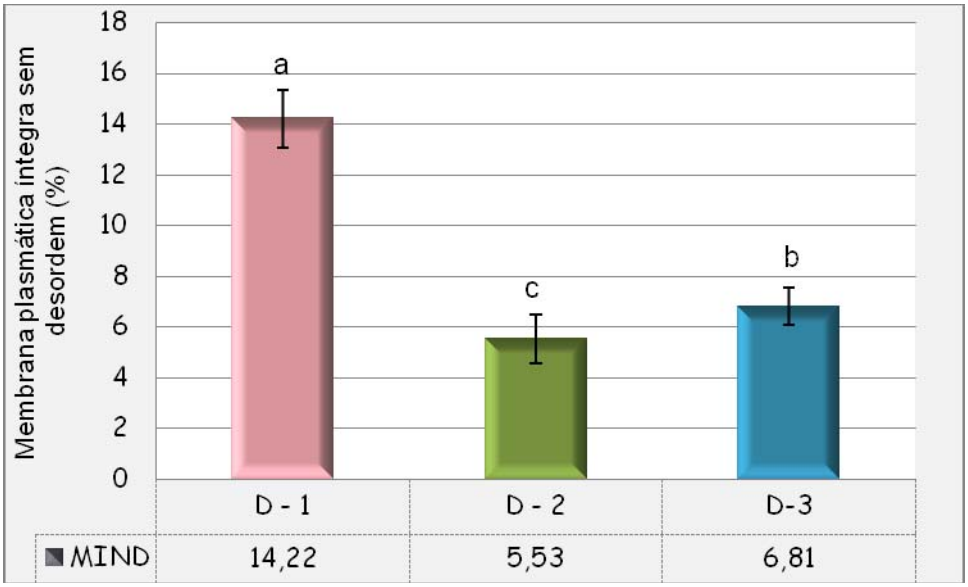
D - 1 – Diluidor Botu-Bov®, a base de gema de ovo.
D - 2 – Diluidor Botu-Bov®, a base de lecitina de soja.
D - 3 – Diluidor AndroMed®, a base de lecitina de soja.

Gráfico 3 - Médias ±erros padrão da quantidade de células espermáticas (%), após descongelação, com membrana plasmática íntegra e sem reação acrossomal (acrossomo íntegro) nos três diferentes tratamentos – Pirassununga - 2009

6.3 EFEITOS DOS DIFERENTES DILUIDORES SOBRE A ESTABILIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA

Como descrito anteriormente no material e métodos, para essa avaliação foi utilizada a associação das sondas H33342, Yo-Pro-1 e Merocianina 540, a qual classificou as amostras em três categorias (ML, MND, MID).

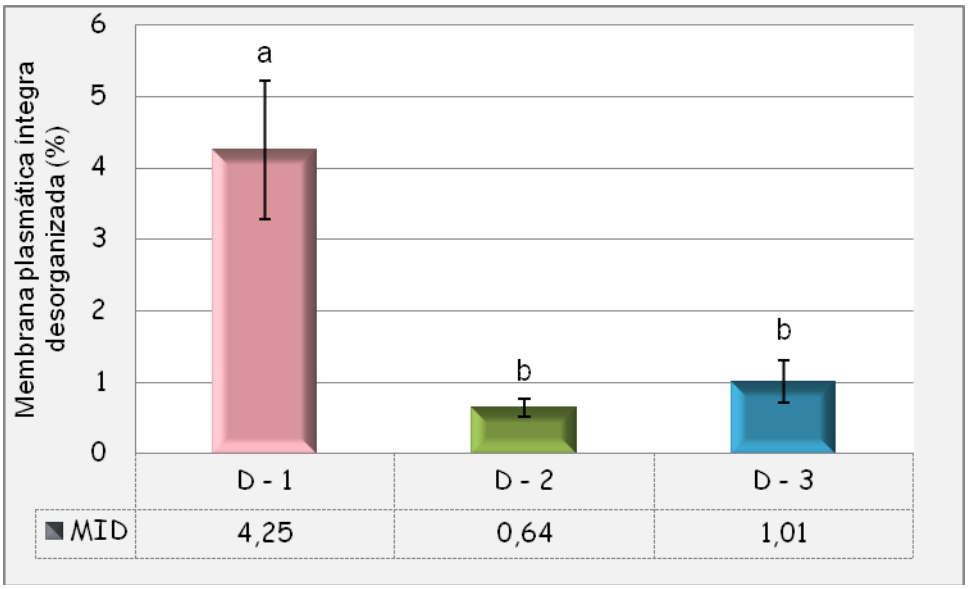
O diluidor 1 Botu-Bov® apresentou uma maior porcentagem de células com membrana plasmática íntegra estável (p<0,05) do que os demais diluidores estudados (Gráfico 4).



D - 1 – Diluidor Botu-Bov®, a base de gema de ovo.
D - 2 – Diluidor Botu-Bov®, a base de lecitina de soja.
D - 3 – Diluidor AndroMed®, a base de lecitina de soja.

Gráfico 4 - Médias ±erros padrão da quantidade de células espermáticas (%), após descongelação, com membrana plasmática íntegra estável nos três diferentes tratamentos – Pirassununga - 2009

O diluidor 1 Botu-Bov® também apresentou uma maior porcentagem de células com membrana plasmática íntegra desorganizada (p<0,05) do que os demais diluidores. Entre os diluidores 2 e 3 não foi observada diferença estatística (Gráfico 5).

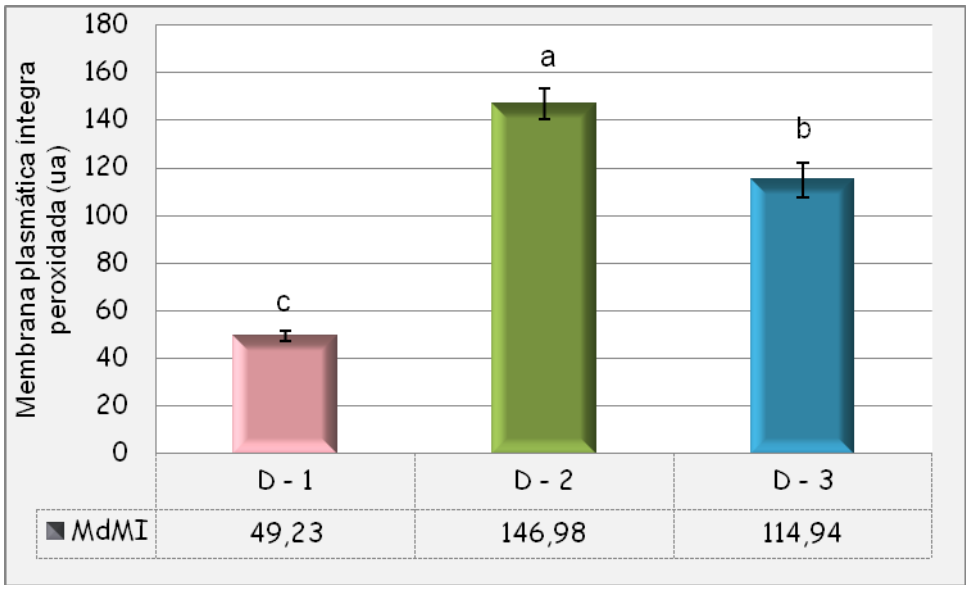


D - 1 – Diluidor Botu-Bov®, a base de gema de ovo.
D - 2 – Diluidor Botu-Bov®, a base de lecitina de soja.
D - 3 – Diluidor AndroMed®, a base de lecitina de soja.

Gráfico 5 - Médias ±erros padrão da quantidade de células espermáticas (%), após descongelação, membrana plasmática íntegra desorganizada nos três diferentes tratamentos – Pirassununga – 2009

6.4 EFEITOS DOS DIFERENTES DILUIDORES SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA ESPERMÁTICA

A associação das sondas H33342, C11-BODIPY$^{581/591}$ e IP mostrou diferença estatística ($p<0,05$), das amostras após a descongelação, nos três tratamentos estudados. No diluidor 2 houve maior peroxidação lipídica (Gráfico 6).



D - 1 – Diluidor Botu-Bov®, a base de gema de ovo.
D - 2 – Diluidor Botu-Bov®, a base de lecitina de soja.
D - 3 – Diluidor AndroMed®, a base de lecitina de soja.

Gráfico 6 - Médias ±erros padrão dos valores lineares médios da intensidade de fluorescência da população espermática com membrana plasmática íntegra apresentando peroxidação lipídica, no sêmen após descongelação nos três diferentes tratamentos – Pirassununga - 2009

7 Discussão

7 DISCUSSÃO

Nesse experimento foram realizadas várias técnicas de avaliação com as quais foi possível observar que o sêmen descongelado possui sub populações distintas como relatado por Muiño et al. (2008a) e Andrade (2009). Essas sub populações eram constituídas de espermatozóides com membrana plasmática lesada (positivo para PI ou Yo-Pro-1), membrana plasmática íntegra 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 terem membrana plasmática íntegra possuem o acrossomo reagido (negativo para PI 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.

Uma das mais importantes características associada com a capacidade fertilizante do sêmen, estudada neste experimento, é a motilidade, pois é essencial para o transporte do espermatozóide no trato reprodutivo feminino e para a fertilização (VERSTENGEN, 2002).

O presente experimento obteve os percentuais de motilidade total e progressiva detectados pelo CASA diferentes entre os diluidores utilizados. Embora tenham sido claros os efeitos dos componentes dos diluidores neste experimento (como gema de ovo e lecitina de soja), esta discussão será restrita aos efeitos de congelação entre diluidores de composição diferentes, não sendo discutidos os efeitos de cada constituinte, pois a composição química de cada diluidor não foi divulgada.

O percentual da motilidade total no diluidor Botu-Bov® contendo gema de ovo foi de 42, 41%, no Botu-Bov®, contendo lecitina de soja foi de 20,08% e no diluidor AndroMed® também com lecitina de soja de 19,90%. Já os resultados de motilidade progressiva foram de 36,27%, 17,47% e 16,06%, respectivamente, mostrando que o diluidor a base de gema de ovo obteve melhores resultados no presente experimento. Corroborando os resultados de motilidade obtidos por Wagtendonk-de Leeuw et al. (2000) que testando a fertilidade do sêmen bovino criopreservado em

dois diluidores diferentes, mostraram que a motilidade foi maior no meio a base de gema de ovo do que naquele a base de lecitina de soja. Afirmaram ainda que os efeitos benéficos da gema de ovo durante a criopreservação são difíceis de serem atingidos por outros crioprotetores. Também foram encontrados resultados similares no estudo de Thun et al. (2002) comparando o diluidor TRIS-gema, com o Biociphos-Plus® e de Celeghini et al. (2008) utilizando os diluidores Botu-Bov® (a base de gema de ovo) e Bioxcell® (a base de lecitina de soja).

Contrariando os resultados do presente experimento Aires et al. (2003) obtiveram melhores resultados de motilidade no meio a base de lecitina de soja sugerindo que isso possa ser resultado da alta viscosidade e presença de debris nos diluidores a base de gema de ovo o que influencia na função espermática.

Para Arruda (2000) há fortes evidências que para os parâmetros motilidade progressiva, VAP, VSL, VCL, BCF, STR, LIN e velocidade rápida, quanto maior for o valor numérico obtido, melhor deverá ser a qualidade espermática para cada uma destas características estudadas. As velocidades espermáticas avaliadas no presente experimento, VAP, VSL e VCL, foram maiores para o diluidor AndroMed® (89,65μm/s; 70,31μm/s; 163,53μm/s; respectivamente), este achado pode ser explicado pela diferença de densidade ou presença de partículas entre os diluidores estudados, que poderiam influenciar nas velocidades espermáticas. O mesmo foi encontrado por Moussa et al. (2002); Amirat et al. (2004) e Celeghini et al. (2008).

A BCF foi mais alta para os diluidores a base de lecitina de soja (sendo de 30,34 Hz para o Botu-Bov® lecitina de soja foi de 30,11 Hz para o AndroMed®) o que pode sugerir que componentes presentes nestes diluidores poderiam estar agindo para estimular a frequência de batimentos. Esse resultado contraria o observado por Celeghini et al. (2008) que encontraram maior valor de BCF no diluidor Botu-Bov® (gema de ovo).

A STR foi estatisticamente diferente nos três diluidores, sendo maior numericamente no Botu-Bov® a base de lecitina de soja (88,44%). Estes resultados se assemelham aos observados por Arruda (2000) para sêmen criopreservado de equinos em diferentes diluidores e difere dos encontrados por Celeghini et al. (2008) cujo valores de STR para o Botu-Bov® foram maiores.

Os processos de congelação e descongelação induzem a mudanças semelhantes à capacitação (criocapacitação), os danos associados à

criocapacitação parecem suficientes para facilitar e/ou provocar uma capacitação funcional (CORMIER; BAILEY, 2003). Dentre essas mudanças estão aumento das células hiperativas, da reação acrossomal e da desordem da membrana plasmática do espermatozóide.

Em relação às células hiperativas foi encontrado maior valor no diluidor AndroMed® (12,50%). Os parâmetros utilizados para detecção dessas células foram o VCL (já discutido anteriormente), o ALH e LIN. De um modo geral, o deslocamento lateral de cabeça não é desejado, pois pode interferir na progressão da célula. Arruda (2000) afirmou que quanto maior o valor numérico de ALH pior é a qualidade do sêmen. O menor valor de ALH foi obtido no sêmen criopreservado com Botu-Bov® lecitina de soja (5,33μm) e no Botu-Bov® (5,57μm) o mesmo encontrado por Celeghini et al. (2008).

O menor valor encontrado de LIN foi com o uso do diluidor AndroMed® (48,26%), sendo este resultado condizente com aquele encontrado por Celeghini et al. (2008).

Muiño et al. (2008a) e Muiño et al. (2008b) identificando sub-populações de sêmen definidas pelas características da motilidade em ejaculados encontraram uma porcentagem em torno de 15 a 16% de uma sub-população semelhante às células hiperativas no sêmen criopreservado. Resultados estes muito semelhantes ao obtido no presente experimento com o uso do diluidor AndroMed® (12,5%). Nos diluidores Botu-Bov® o percentual de células hiperativas foi de 6,66% e no Botu-Bov® lecitina de soja foi de 6,61%, esse resultado pode ser visto como uma vantagem para esses diluidores.

Quanto à reação acrossômica, os espermatozóides diluídos no meio Botu-Bov® foram os que obtiveram a menor porcentagem (32,5%) e aqueles diluídos no AndroMed® a maior (50,7%). Estes resultados foram a favor do que relataram Herold et al. (2006), que mostraram um número superior de acrossomos intactos com o uso de um diluidor comercial a base de gema de ovo. Já Aires et al. (2003) não encontraram diferenças significativas na reação acrossomal após o *swin-up* comparando dois diluidores diferentes.

Os efeitos dos diluidores sobre a integridade da membrana plasmática observados no presente experimento cujos resultados foram melhores para o diluidor Botu-Bov® à base de gema de ovo (18,3%) confirmaram as observações

feitas por De Leeuw et al. (1993) que relataram efeitos dos componentes dos diluidores sobre a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides criopreservados. Celeghini et al. (2008) encontraram resultados semelhantes porém, Amirat et al. (2004) não verificaram diferença quando comparam um diluidor contendo lipoproteína de baixa densidade a um diluidor contendo gema de ovo.

Thun et al. (2002) obtiveram maior porcentagem de membrana lesada após o processo de criopreservação no diluidor a base de lecitina de soja, indicando segundo os autores, uma baixa eficiência desse diluidor em proteger o espermatozóide durante a congelação e a descongelação. Pons-Rejraji et al. (2009) utilizando crioprotetores a base de gema de ovo, observaram que, após o processo de criopreservação, 50% dos espermatozóides sobreviveram e destes, apenas 23% possuía acrossomo íntegro.

O aumento na instabilidade de membrana quando avaliada pela merocianina 540 é menor do que o reportado por estudos que utilizaram a clortetraciclina. No entanto, isso se deve ao fato de que esses métodos monitoram diferentes eventos durante o processo de capacitação. A desordem de fosfolipídios detectada pela merocianina 540 é induzida pelo bicarbonato que ocorre no início do processo, enquanto a clortetraciclina monitora eventos mais tardios durante a capacitação e exocitose acrossômica iniciada pelo deslocamento do íon cálcio (HALLAP et al., 2006).

A percentagem de células com membrana plasmática íntegra com estabilidade da membrana plasmática foi maior no diluidor Botu-Bov® (14,22%) em comparação ao AndroMed® (6,81%) e ao Botu-Bov® lecitina de soja (5,53%). Saravia et al. (2007) relataram que, após a descongelação, ocorreu um aumento do número de espermatozóides mortos, sem um aumento evidente na instabilidade lipídica da membrana plasmática dos espermatozóides vivos. Contrariando, Stradaioli et al. (2007) que ao compararem um diluidor a base de gema de ovo com um a base de lecitina de soja (Bioxcell®), mostraram que o segundo meio obteve maior número de células não capacitadas e sem o acrossomo reagido.

A criopreservação do sêmen bovino do presente experimento demonstrou resultados insatisfatórios, como a baixa porcentagem de membrana plasmática íntegra. Isso pode ser explicado pelo fato de que, os touros utilizados não foram

animais selecionados para a congelação e, além disso, estavam em condições de manejo extensivo sem complementação de concentrado na dieta.

Segundo Aurich (2005) e Lamirande e O'Flahert (2008) a peroxidação lipídica é conseqüência da ação de espécies reativas de oxigênio que em baixas concentrações, aparentemente, promove apenas a capacitação espermática enquanto que a peroxidação excessiva danifica a membrana plasmática e resulta na perda de motilidade, lesão de membrana, depleção de ATP e perda da fertilidade.

Existem fortes evidências que as ROS promovam a capacitação espermática. Um dos mecanismos é pelo aumento da fosforilação da proteína tirosina com um padrão similar àquele produzido pelo AMPc, embora isso não possa explicar todos os efeitos das ROS. Ainda não se sabe qual espécie reativa está envolvida, mas o superóxido e o peróxido podem ter seus efeitos específicos (FORD, 2004).

É possível que a morte celular ou a perda de função durante ou após a congelação e a descongelação envolva um estresse oxidativo. ROS como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) diminui a motilidade espermática. A morte do espermatozóide bovino também envolve a ativação de um aminoácido oxidase que gera o H_2O_2 (BILODEAU et al., 2002).

Bilodeau et al. (2002), comparando sêmen diluído em um meio a base de gema de ovo e em TALP *sperm* mostraram uma limitada capacidade do diluidor a base de gema de ovo em neutralizar os efeitos deletérios do peróxido de hidrogênio na motilidade. Porém, isso não foi observado no presente experimento, pois as células espermáticas do tratamento que utilizou diluidor a base de gema de ovo apresentaram melhor motilidade (42,41%).

O sêmen possui um sistema *redox* onde há um delicado balanço entre o potencial antioxidante do plasma seminal e espermatozóides. Entre os antioxidantes não enzimáticos presente no plasma seminal está a glutationa que possui um papel na redução do peróxido de hidrogênio. Diluidores a base de gema de ovo, utilizados na criopreservação do espermatozóide bovino levam a uma diminuição da glutationa que não é compensada pelo diluidor (STRADAIOLI et al., 2007).

Contrariando novamente os resultados do presente experimento, no qual, o tratamento com o diluidor Botu-Bov® obteve o menor resultado de membrana plasmática íntegra peroxidada (49,23ua), Stradaioli et al. (2007) obtiveram melhor desempenho em manter os níveis de glutationa, motilidade espermática e

integridade de membrana no meio a base de lecitina de soja. Esses resultados são provavelmente devidos, em parte, à capacidade da glutationa em reduzir o ataque da membrana plasmática do espermatozóide pelas ROS.

Conforme visto, desde o início do século, cientistas têm procurado intensamente desenvolver ensaios laboratoriais que predizem acuradamente a fertilidade do sêmen congelado. No entanto, tais metas têm sido de difícil obtenção, uma vez que a maior parte dos problemas reside nos diferentes atributos que o espermatozóide deve possuir para fertilizar o ovócito, e em como a fertilização é definida. Infelizmente, nenhum teste laboratorial isolado pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen congelado (ARRUDA, 2000).

8 Conclusões

8 CONCLUSÕES

1. O diluidor a base de gema de ovo preserva melhor a motilidade espermática, a população de células com integridade de membrana plasmática e acrossomo não reagido no sêmen bovino pós-descongelação que os diluidores a base de lecitina de soja.
2. Espermatozóides criopreservados com o diluidor a base de gema de ovo possuem uma menor sub população de células hiperativas quando comparados com os diluidores a base de lecitina de soja.
3. A sub população de espermatozóides com membrana plasmática estável é melhor preservada no diluidor a base de gema de ovo.
4. O diluidor a base de gema de ovo possibilita que as células sofram uma menor peroxidação lipídica das membranas espermáticas que os diluidores a base de lecitina de soja.

Referências

REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Balanço da Pecuária Bovidea de Corte. 13/12/2006. Disponível em: <www.abiec.com.br/estatisticas_relatorios.asp> Acessado em: 25 mar. 2007.

ABOU-HAILA, A.; TULSIANI, D. R. P. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 379, n. 2, p. 173-182, 2000.

AIRES, V. A.; HINSCH, K-D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, n. 2, p. 269–279, 2003.

AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.

AITKEN, R. J. Molecular mechanisms regulating sperm function. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 169-173, 1997.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; KNOX, W.; PATERSON, M.; IRVINE, D. S. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterized by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorilation. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 645-656, 1998.

AITKEN, R. J. Founders'lecture - Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 655-664, 2004.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RALFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Membrane structure. In:___. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Publishing. 1994. p. 478-506.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W.; Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J. L.; ANTON, M. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v. 61, p. 895-907, 2004.

ANDRADE, A. F. C. **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, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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. 134 f. Tese (Livre docência em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G. LIU, I. K. M. Flow cytometric determination of plasmatic membrane and acrosomal integrity of the stallion spermatozoa. **Acta Science Veterinary**, v. 31, p. 226-227, 2003.

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

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

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M. C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 895-902, 2000.

BAUMBER, J.; MEYERS, S. A. Changes in membrane lipid order with capacitation in Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 4, p. 578-587, 2006.

BERGERON, A.; CRÊTE, M-H.; BRINDLE, Y.;MANJUNATH, P. Low density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 70, p.708–717, 2004.

BILODEAU, J. F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRARD, M. A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v. 57, p. 1105-1122, 2002.

BREIBART, H.; NAOR, Z. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 151-159, 1999.

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

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Tese

(Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Pratical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction Domestic Animal**, 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 extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 119-131, 2008.

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

CHENG, FENG-PANG.; FAZELI, A.; VOORHOUT, W. F.; MARKS, A.; BEVERS, M. M.; COLENBRANDER, B. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucid-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. **Journal Andrology**, v. 17, n. 6, p. 674-682, 1996.

COLENBRANDER, B.; RATHI, R.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M. Capacitation related changes in stallion spermatozoa. In: Proceedings of a workshop entitled From Epidiymis to embryo. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, n. 6, p. 24, 2001.

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.

COOPER, T. G.; YEUNG, CHING-HEI. A flow cytometric technique using peanut agglutinin for evaluating acrosomal loss from human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 5, p. 542-550, 1998.

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.

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

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

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

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

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 48, p. 466-470, 1997.

DE LEEUW, F. E.; DE LEEUW, A. M.; DEN DAAS, H. G.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on Bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v. 30, p. 32-44, 1993.

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.

FERRARI, S. **Meios de capacitação espermática na espécie ovina (*Ovis áries*, *Linnaeus,* 1758):** reação acrossômica e penetração *in vitro* em oócitos zona-free de hamster. 1997. 71 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469,p. 197-235, 2000.

FLESCH, 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, 2001.

FORD, W. C. L. `Regulation of sperm function by reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v. 10, n. 5, p. 387-399, 2004.

GABALDI, S. H.; WOLF, A.; ESPER, C. R. Os eventos da fertilização em mamíferos. **Ciências Agrárias e Saúde**, v. 2, n. 2, p. 61-65, 2002.

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

GARNER, D.L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in

cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-1406, 1997.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole Ltda, 2004. cap. 7, p. 97-110.

GRAHAM J. K.; FOOTE RH. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v. 24, p. 42-52, 1987.

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

GRAHAM, J. K. Response of spermatozoa to freezing. In: TECHNIQUES FOR HANDLING AND UTILIZATION OF TRANSPORTED COOLED AND FROZEN EQUINE SPERMATOZOA, 1995, Fort Collins. **Proceedings…** Fort Collins, Colorado, USA.: Colorado State University Fort Collins, 1995. p. 83-95.

GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** v. 28, p. 187-195, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Fertilização e clivagem. In:___. **Reprodução nimal**. São Paulo: Manole, 2004. p. 111-126

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v. 65, p. 1122-1136, 2006.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

HAN-CHEN HO; SUAREZ, S. S. An inositol 1,4, 5-Trisphosphate receptor-gated intracellular Ca^{2+} store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. **Biology of Reproduction**, v. 65,p. 1606-1615, 2001.

HARRISON, R. A. P.; ASHWORTH, P. J. C.; MILLER, N. G. A. Bicarbonate/CO_2, 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.

HEROLD, F. C.; HAAS, K.; COLENBRANDER, B.; GERBER, D. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl™ or AndroMed®. **Theriogenology**, v. 66, p. 1123-1130, 2006.

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

JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria**, v. 10, p. 156-165, 1994.

JOHNSON, L.; VARNER, D. D.; ROBERTS, M. E.; SMITH, T. L.; KEILLOR, G. E.; SCRUTCHFIELD, W. L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 471-480, 2000.

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, n. 4, p. 438-444, 2007.

LAMIRANDE, E.; LECLERC, P.; GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 175-194, 1997.

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

LUCONI, M.; PORAZZI, I.; FERRUZZI, P.; MARCHIANI, S.; FORTI, G.; BALDI, E. Tyrosine phosphorylation of the A Kinase Anchoring Protein 3 (AKAP3) and soluble adenylate cyclase are involved in the increase of human sperm motility. **Biology of reproduction**, v. 72, p. 22-32, 2005.

MARIE, D.; VAULOT, D.; PARTENSKY, F. Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, Yo-Pro-1, and picogreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1649-1655, 1996.

MARQUES, A.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GOBESSO, A. A. O.; NEVES NETO, J. R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline 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.

MARQUEZ, B.; SUAREZ, S. S. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca^{2+} influx[1]. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 660-665, 2007.

MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction of Fertility and Development**, v. 8, p. 1165-1178, 1997.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraotimal rates. **Cryobiology**, v. 14, p. 251-272, 1977.

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.

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

MORTIMER, S. T.; MAXWELL, W. M. C. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. **Reproduction Fertility Development**, v. 11, p. 25-30, 1999.

MORTIMER, S. T. CASA – Practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

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

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

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

MURATORI, M.; PORAZZI, I.; LUCONI, M.; MARCHIARI, S.; FORTI, G.; BALDI, E. Annexin V binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 5, p. 797-810, 2004.

NEHRING, H.; ROTHE, L. Insemination of cryopreserved bull semen portions with reduced sperm numbers after dilution with two egg yolk-free extenders. In: EUROPEAN A.I. VETS MEETING, 15., 2003, Budapest. **Proccedings…** Budapest: Cattle Session, 2003. p. 14.

ÕURA, K.; TOSHIMORI, K. Ultra structural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v. 122, p. 105-151, 1990.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PARKS, J. E. Hypothermia and Mammalian gametes, In: KAROW, A. M.; CRITSER, J. K. (Ed.). **Reproduction tissue banking**: scientific principles. San Diego: Academic Press. 1997. p. 229-261.

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* assessed by chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v. 46, p. 131-140, 1996.

PICKETT, B. W.; Principles of cryopreservation. In*:* TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS, 1986, Fort Collins. **Proceedings…** Fort Collins, Colorado, USA.: Colorado State University, 1986. p.1-5.

PONS-REJRAJI, H.; BAILEY, J. L.; LECLERC, P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p. 525-537, 2009.

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y.; WHITE, I. G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 403-407, 1980.

QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; TERESA RIGAU, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology**, v. 59, p. 1973-1990, 2003.

RAPHAEL, C. F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide eqüino refrigerado**. 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

SARAVIA, F.; HERNÁNDEZ, M.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate. **International Journal of Andrology**, v. 30, 485-499, 2007.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.

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

STRADAIOLI, G.; NORO, T.; SYLLA, L.; MONACI, M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. **Theriogenology**, v. 67, p. 1249-1255, 2007.

STRAUSS, G.; INGENITO, E. P. Stabilization of liposome bilayers to freezing ant thawing: effects of cryoprotective agents and membrane proteins. **Cryobiology**, v. 17, p. 508-515, 1980.

SUAREZ, S. S. Control of hyperactivation in sperm. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 6, p. 647-657, 2008.

SUKARDI, S.; CURRY, M. R.; WATSON, P. F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science**, v. 46, p. 89-96, 1997.

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, C. A.; GARNER, D. L.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 786-793, 1998.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, v. 57,p. 1087-1094, 2002.

TRIMECHE, A.; ANTON, M.; RENARD, P.; GANDEMER, G.; TAINTURIER, D. Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. **Cryobiology**; v. 34, p. 385-393, 1996.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIM, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VISCONTI, P. E.; BAILEY, J.; MOORE, G.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P.; KOPF, G. Capacitation of mouse spermatozoa. Part1. 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.

WAGTENDONK-DELEEUW, A. M.; HARING, R. M.; KAAL-LANSBERGEN, L. M. T. E.; DENDAAS, J. H. G. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. **Theriogenology**, v. 54, p. 57-67, 2000.

WATSON, P. F. Artificial insemination and the preservation of semen. In: LAMMING, G. E. **Marshall's physiology of reproduction** 4. ed. London: Churchill Livingstone, 1990. p. 747-835.

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. 482-492, 2000.

WERTHEIMER, E. V.; SALICIONI, A. M.; WEIMIN, L.; TREVINO, C. L.; CHAVEZ, J.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E. O.; DARSZON, A.; VISCONTI, P. E. Chloride is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 51, p. 35539-35550, 2008.

ZHANG, X.; LIN, M. Tracing sperm acrosome differentiation in the testis and maturation in the epididymis of the tammar wallaby (*macropus eugenii*) with a 45-kDa acrosome-membrane-associated protein. **Reproduction Fertility and Development**, v. 14, p. 69-77, 2002.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A

Setup para análise do sêmen bovino: ajuste do aparelho Hamilton Thorne Research

Características	**Ajuste**
Número de imagens adquiridas.....	30
Taxa de aquisição das imagens.....	60 Hz
Contraste mínimo da célula.....	50
Tamanho mínimo da célula.....	6 pixels
Contraste para células imóveis.....	30
Retilinearidade.....	60%
Valor de corte de VAP para células lentas.....	30,0 μm/s
VAP mínimo para células progressivas.....	40,0 μm/s
Valor de corte de VSL para células lentas.....	20,0 μm/s
Tamanho da célula.....	6 pixels
Intensidade da célula.....	80
Tamanho da cabeça estática.....	0,23 a 1,91
Intensidade da cabeça estática.....	0,56 a 1,20
Alongamento estático.....	8 a 92
Aumento.....	1,89
Frequência de vídeo.....	60
Intensidade de iluminação.....	2203
Temperatura.....	37°C

ANEXO B

1 Solução de sais de Talp (preparo de 500 mL)

Componentes:

NaCL..... 2,100 g

KCl..... 0,935 g

NaH_2PO_4..... 0,025 g

MgCl $6H_2O$..... 0,040 g

Hepes..... 3,250 g

Preparo:

Diluir MgCl $6H_2O$ 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