UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal

TEMPO DE EQUILÍBRIO, LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE E COLESTEROL NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO

TICIANO GUIMARÃES LEITE

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2012

Ticiano Guimarães Leite

Tempo de equilíbrio, lipoproteínas de baixa densidade e colesterol na criopreservação do sêmen bovino

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área: Reprodução Animal
Orientador: Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho

Co-Orientadores:
Prof. Venício José de Andrade
Prof. Rubens Paes de Arruda

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2012

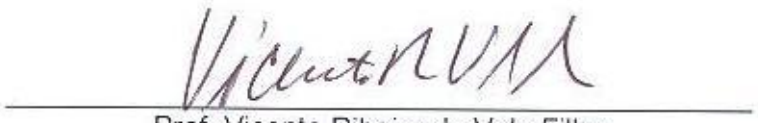
Leite, Ticiano Guimarães, 1983-
L533t Tempo de equilíbrio, lipoproteínas de baixa densidade e colesterol na criopreservação do sêmen bovino / Ticiano Guimarães Leite. – 2012.
149 p. : il.

Orientador: Vicente Ribeiro do Vale Filho
Co-orientadores: Venício José de Andrade, Rubens Paes de Arruda
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

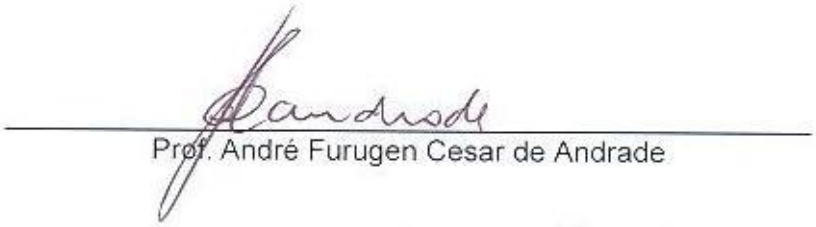
1. Bovino – Reprodução – Teses. 2. Sêmen congelado – Teses. 3. Criopreservação – Teses. 4. Lipoproteínas – Teses. 5. Colesterol – Teses. I. Vale Filho, Vicente Ribeiro do. II. Andrade, Venício José de. III. Arruda, Rubens Paes de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.208 926

Tese defendida e aprovada em 25 de Junho de 2012, pela comissão examinadora constituída por:



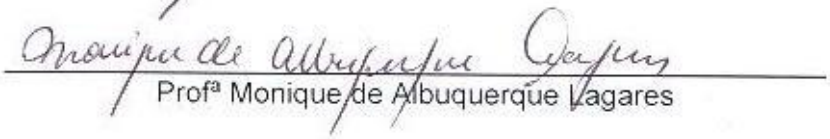
Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho
Presidente



Prof. André Furugen Cesar de Andrade



Prof. Guilherme Ribeiro Valle



Profª Monique de Albuquerque Lagares



Prof. Martinho de Almeida e Silva

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 141/2011,** relativo ao projeto intitulado "***Estudo das interações entre o tempo de equilíbrio e diluidores contendo LDL e colesterol na criopreservação do sêmen bovino***", que tem como responsável(is) **Vicente Ribeiro do Vale Filho** , está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo ***Comitê de Ética em Experimentação Animal*** **(CETEA/UFMG),** tendo sido aprovado na reunião de **8/ 06/2011.**

Este certificado expira-se em **8/ 06/ 2016.**

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 141/2011,** related to the project entitled "***Study of interactions betwwn equilibration time and extenders containing LDL and cholesterol on bovine semen cryopreservation***", under the supervisiors of **Vicente Ribeiro do Vale Filho,** is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the ***Ethics Committee in Animal Experimentation*** **(CETEA/UFMG),** and was approved in **June 8, 2011.**

This certificate expires in **June 8, 2016.**

Belo Horizonte, 13 de Junho de 2011.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

Aos meus pais, ***Heber Antônio Leite*** *e* ***Maria Ana Ferreira Leite****, pelo amor, carinho, apoio, pelos sacrifícios e pelos exemplos de determinação e honestidade, que permitiram a realização deste sonho.*

À Minha irmã ***Emilly****, por sua amizade e pelo incentivo.*

Aos meus primos ***Renzzo e Julian****, pela eterna amizade.*

À ***Andreza****, minha noiva e futura esposa, pelo amor, carinho e paciência. Por sempre estar ao meu lado e por me apoiar nos momentos mais difíceis. Por acreditar em mim, e sonhar com um futuro melhor ao meu lado. Por me mostrar o que é o verdadeiro amor. Meu amor, minha vida, meu moranguinho, a dona do meu coração. Você é muito importante para a minha vida.*

Dedico

“Ainda que eu falasse a língua dos homens.
E falasse a língua dos anjos, sem amor eu nada seria.

É só o amor, é só o amor.
Que conhece o que é verdade.
O amor é bom, não quer o mal.
Não sente inveja ou se envaidece.

O amor é o fogo que arde sem se ver.
É ferida que dói e não se sente.
É um contentamento descontente.
É dor que desatina sem doer.

Ainda que eu falasse a língua dos homens.
E falasse a língua dos anjos, sem amor eu nada seria.

É um não querer mais que bem querer.
É solitário andar por entre a gente.
É um não contentar-se de contente.
É cuidar que se ganha em se perder.

É um estar-se preso por vontade.
É servir a quem vence, o vencedor;
É um ter com quem nos mata a lealdade.
Tão contrário a si é o mesmo amor.

Estou acordado e todos dormem.
Todos dormem. Todos dormem.
Agora vejo em parte. Mas então veremos face a face.
É só o amor, é só o amor.
Que conhece o que é verdade.

Ainda que eu falasse a língua dos homens.
E falasse a língua dos anjos, sem amor eu nada seria.”

Monte Castelo

Renato Russo (recortes do Apóstolo Paulo e de Camões).

“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana.”

Charles Darwin

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor... Lembre-se. Se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele você conquistará o mundo.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha família, sem a qual não teria realizado este sonho.

Aos meus pais pelo apoio (financeiro e emocional), amizade, carinho, compreensão, pelos exemplos de caráter e dignidade, e principalmente por acreditarem em mim, mesmo quando eu me encontrava em momentos de angústia e desespero.

À minha família, minha irmã **Emilly** e meu sobrinho **Luís Gustavo**, meu cunhado **Fábio Vara** (por tomar conta da minha irmã, deixando ela feliz), meus tios **Ivan Leite** e **Célia**, as primas **Camila** e **Cristiane**, minha tia **Itacymary**, pela ajuda inicial em Belo Horizonte e apoio nos momentos difíceis. E a minha família de Goiás e de Minas (todos os tios, tias, e primos), que sempre estão torcendo por mim; aos meus primos **Renzzo e Julian**, meus melhores amigos, pela eterna amizade, e as valorosas conversas.

À minha segunda família em BH: **Vanessa**, **Carlos**, **Bebeto**, **Marina**, **Flávio**, e a todos os membros dessa grande família que me recebeu como filho e que sempre me apoiaram e incentivaram, tanto profissionalmente quanto no meu relacionamento com a **Andreza**.

Ao **Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho**, pela orientação, apoio, conselhos, pelos valiosos ensinamentos e principalmente pela amizade e agradável convívio durante essa caminhada.

Ao **Prof. Venício José de Andrade**, por sua grande colaboração como co-orientador, por sua amizade, companheirismo, pelos valiosos conselhos e sugestões, e pelos momentos de descontração que me trouxeram alegria nessa fase tão conturbada.

Ao **Prof. Rubens Paes de Arruda**, pela co-orientação, pelo apoio, pela amizade, pelo grande exemplo como profissional, pesquisador e como educador, pela inestimável colaboração nas idéias que conduziram a esta tese. Pela grande oportunidade de realizar parte do experimento nas dependências da USP em Pirassununga, e pelo grande exemplo como ser humano. Minha admiração e minha gratidão.

Ao **Prof. André Furugen César de Andrade** pela grande colaboração nas análises por citometria de fluxo, por aceitar participar da minha banca de defesa, e principalmente pela sua amizade, a qual pretendo manter para sempre.

Ao **Prof. Martinho de Almeida e Silva**, pela colaboração, pelas valiosas sugestões e pelo grande apoio no delineamento e nas análises estatísticas dos dados deste experimento.

À **Prof. Angela Maria Quintão Lana** e ao estatístico **Danilo Gonçalves Bastos** pelo auxílio com os softwares estatíticos e na análise estatística dos dados.

À ABS Pecplan na figura do **Dr. Neimar Corrêa Severo**, (Gerente de Produção da ABS Pecplan), por permitir a utilização dos animais e instalações da ABS Pecplan (Uberaba) para a realização deste experimento.

Ao **Dr. Fábio Morato Monteiro**, pelo apoio e por permitir a realização do pré-experimento com os animais e as instalações do Instituto de Zootecnia (IZ) de São Paulo, em Sertãozinho.

À **Profª Maria Isabel Vaz de Melo** pela amizade e pelas sugestões na correção da Tese.

Aos alunos de Iniciação Científica: **Cintia Libéria Faria Santos, Rui Pitagoras de Lima Castro Filho, Paloma Fonte Boa**, e **Igor Paz Andrade**, pela ajuda na purificação do LDL e na preparação dos meios, e por ficarem até tarde no laboratório me ajudando.

Aos amigos da Casa do VRA (USP-Pirassununga) **Daniela Franco da Silva; Roney dos Santos Ramos (Gaúcho); Moana Rodrigues França; Milena Lopes Oliveira; Henrique Fulanete Carvalho; Thiago Santin (arroz); Milton Maturana Filho; Shirley Andrea Flores Rodriguez (Shakira)** por me ajudarem durante a minha estadia na casa do VRA, e pela grande amizade.

Às amigas, **Daniela Franco da Silva** e **Gisele Mouro,** pela grande ajuda nas análises no citômetro de fluxo na FMVZ-USP. Pela amizade, e pelos momentos de descontração que me proporcionaram durante minha passagem por Pirassununga.

Aos estagiários da ABS Pecplan, **Paulo Francisco Bizinotto Nogueira** e **Rayssa Silva Guerrero**, pela grande ajuda na coleta e criopreservação do sêmen, e pela amizade.

Aos técnicos do laboratório da ABS Pecplan, Sr. **João** e **Divaldo,** e todos os demais funcionários da ABS pela grande ajuda na execução do experimento.

Aos meus amigos e "irmãos de orientação": **Lucas L. Emerick**, **Jorge André M. Martins**, **Fernando A. Souza**, **Paulo Eduardo M. Gonçalves**, **Pablo Fabrício B. Pinto**, **Zé Eduardo Murta**, **Guilherme Silva Moura**, **Gilson Passos de Moraes**, **Felipe Albano**, que contribuíram na realização desse experimento, e que me ensinaram muito sobre convívio e sobre amizade.

Aos amigos da pós-graduação, **Lucas Maciel Cunha** e **Andréia Kelly Roberto Santos** pela amizade e pela ajuda na correção da Tese.

Aos amigos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB): **Jamil, Jaque, Lívia, Thaís, Felipe, Rose (Técnica do lab. de Eletrofisiologia celular)**, e **Prof. Marcelo Santoro.**

À TK congelação, na figura do **Sr. Motta**, pelo fornecimento das três maquinas de congelamento TK-3000, e por acreditar nesse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento da pesquisa.

Aos demais professores e funcionários da Escola de Veterinária da UFMG pelos ensinamentos, ajuda e amizade. A todos os colegas da pós-graduação e a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, mas que, injustamente, por um lapso de memória não foram citados.

E por último, porém não menos importante, a **Andreza Formaggini Faria Moraes**, minha futura esposa, pelo seu amor, pelo seu carinho e compreensão.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO 22
ABSTRACT 23
1 INTRODUÇÃO 24
2 HIPÓTESES: 25
3 OBJETIVOS: 25
4 REVISÃO DE LITERATURA 26
4.1 O espermatozoide bovino 26
4.1.1 As membranas do espermatozoide 29
4.2 Capacitação espermática 34
4.3 Hipermotilidade 37
4.4 Reação Acrossômica 39
4.5 Peroxidação lipídica 41
4.6 Criopreservação do sêmen 43
4.7 Etapas da criopreservação convencional de sêmen (protocolos) 44
4.8 Princípios da criopreservação do espermatozoide bovino 47
4.8.1 Efeitos da variação de temperatura 47
4.8.2 Efeitos da Osmolaridade 48
4.8.3 Efeitos da formação de cristais de gelo 49
4.8.4 Efeitos das taxas de resfriamento 50
4.8.5 O tempo de equilíbrio 51
4.8.6 Efeitos das taxas de congelamento 53
4.8.7 Efeitos do descongelamento 55
4.9 Vitrificação e as novas teorias da criopreservação 56
4.10 Composição dos meios diluidores 57
4.10.1 Agentes crioprotetores 58
4.10.2 Crioprotetores intracelulares (Penetrantes) 59
4.10.3 A função da gema de ovo 61
4.10.4 A substituição da gema de ovo pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) 64
4.10.5 O uso do colesterol na criopreservação do sêmen bovino 66
4.11 Métodos de avaliação do sêmen criopreservado 69
4.11.1 A avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA) 70

4.11.2 Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal 72
4.11.3 Avaliação da estabilidade (fluidez) da Membrana Plasmática 74
4.11.4 A associação de sondas fluorescentes e a citometria de fluxo 75
5 MATERIAL E MÉTODOS 75
5.1 Locais e período experimental 75
5.2 Extração das Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) da gema de ovo 76
5.2.1 Análises químicas do LDL 77
5.3 Preparação das Ciclodextrinas 79
5.4 Preparo dos meios diluidores 80
5.5 Animais e manejo 80
5.6 Coleta e análise do sêmen pré-criopreservação 80
5.7 Diluição e Criopreservação do sêmen 81
5.8 Avaliações do sêmen Pós-descongelamento 82
5.8.1 Avaliação computadorizada das características de motilidade e hiperativação espermática 83
5.8.2 Análises por citometria de fluxo 84
5.8.3 Análises da integridade das membranas plasmática e acrossomal 85
5.8.4 Avaliação da peroxidação das membranas espermáticas 86
5.8.5 Avaliação da estabilidade (fluidez) da membrana plasmática 86
5.8.6 Delineamento experimental e análises estatísticas 87
6 RESULTADOS: 90
6.1 Motilidade espermática pós-descongelamento avaliada pelo CASA 90
6.1.1 Motilidade Total (MOT) 90
6.1.2 Motilidade Progressiva (PROG) 90
6.1.3 Velocidade do trajeto (VAP) 91
6.1.4 Velocidade progressiva (VSL) 91
6.1.5 Velocidade Curvilinear (VCL) 92
6.1.6 Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH) 92
6.1.7 Frequência de Batimentos Flagelares (BCF) 93
6.1.8 Retilinearidade (STR) 93
6.1.9 Linearidade (LIN) 94
6.1.10 Porcentagem de células rápidas (Rapid) 94

6.1.11 Porcentagem de células hiperativas (Hiper) 95
6.2 Análises por citometria de fluxo 95
6.2.1 Porcentagem de células com Membranas Plasmática e Acrossomal Intactas (AIMPI) 95
6.2.2 Porcentagem de células com Membrana Plasmática Intacta (MPI) 97
6.2.3 Porcentagem de células com Membrana Acrossomal Intactas (AI) 97
6.2.4 Peroxidação das membranas espermáticas (Perox MPI) 98
6.2.5 Estabilidade da membrana plasmática 98
7 DISCUSSÃO 101
7.1 Análise computadorizada da motilidade espermática 102
7.2 Análises por citometria de fluxo 107
7.2.1 Integridade das membranas plasmática e acrossomal 107
7.2.2 Peroxidação das membranas espermáticas pós-descongelamento 112
7.2.3 Estabilidade da membrana plasmática 113
8 CONCLUSÕES: 116
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 116
10 ANEXOS 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Correlação entre conteúdo de colesterol de membrana de espermatozoides mamíferos e outros parâmetros de membrana e susceptibilidade ao "choque-frio". _____ 33

Tabela 2 – Teor de matéria seca (%), lípides (%) e proteína (mg/mL) da gema de ovo e do LDL extraído da gema (média de 3 extrações). _____ 79

Tabela 3 - Composição dos meios diluidores fração única para criopreservação de sêmen bovino com e sem Ciclodextrina Carregadas com Colesterol (CLC). _____ 80

Tabela 4 - Análise de variância para delineamento com 4 Diluidores e 3 tempos de equilíbrio 88

Tabela 5 - Médias ± desvios padrão da Motilidade Total (MOT, %) de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 90

Tabela 6 - Médias ± desvios padrão da Motilidade Progressiva (PROG, %) de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 90

Tabela 7 - Médias ± desvios padrão da velocidade do trajeto (VAP; μm/s), de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 91

Tabela 8 - Médias ± desvios padrão da velocidade progressiva (VSL; μm/s), de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 91

Tabela 9 - Médias ± desvios padrão da velocidade curvilinear (VCL; μm/s), de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 92

Tabela 10 - Médias ± desvios padrão da amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH; μm) de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 92

Tabela 11 - Médias ± desvios padrão da frequência de batimentos flagelares (BCF; Hz), de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 93

Tabela 12 - Médias ± desvios padrão da retilinearidade (STR; %), do movimento de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 93

Tabela 13 - Médias ± desvios padrão da linearidade (LIN; %) do movimento de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 94

Tabela 14 - Médias ± desvios padrão da porcentagem de células rápidas (Rapid; %) de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 94

Tabela 15 - Médias ± desvios padrão da porcentagem de células hiperativas (Hiper, %) de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilibrio. _____ 95

Tabela 16 - Médias ± desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal intactas (AIMPI, %), em sêmen bovino criopreservado utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 96

Tabela 17 - Médias ± desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta (MPI, %), em sêmen bovino criopreservado utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 97

Tabela 18 - Médias ± desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal intacta (AI, %), em sêmen bovino criopreservado utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 97

Tabela 19 - Médias ± desvios padrão dos valores lineares médios da intensidade de fluorescência da população espermática com membrana plasmática íntegra (MPI) e coradas com a sonda C11-BODIPY$^{581/591}$ (Perox_MPI) em sêmen bovino criopreservado utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 98

Tabela 20 - Médias ± desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática alterada corados com YO-PRO-1 (Yo-Pro +, %), em sêmen bovino criopreservado utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 99

Tabela 21 - Médias ± desvios padrão da porcentagem de células viáveis não capacitadas, negativas para Merocianina 540 (Meroc (–), %), em sêmen bovino criopreservado utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 100

Tabela 22 - Composição dos meios diluidores para criopreservação de sêmen bovino com e sem Ciclodextrina Carregadas com Colesterol (CLC). _____ 134

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração sumarizando as principais características estruturais do espermatozoide bovino. Detalhes da ultraestrutura da cabeça e da cauda do espermatozoide. (a) região do colo; (b) região da peça intermediária; (c) regiões da peça principal e peça terminal (Adaptado de Barth e Oko, 1989). 27

Figura 2 - Organização da membrana plasmática; modelo "mosaico fluido" de Singer e Nicholson (1972). (Adaptado de: http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia/cito5.php) 30

Figura 3 - Representação esquemática de formas polimórficas de fase observadas nas membranas biológicas. Duas formas polimórficas de fase estão presentes nas membranas das células (painel da esquerda). A forma de bicamada é a mais prevalente; e a hexagonal II forma é muito rara. No painel da direita, o possível papel para a forma hexagonal II (eventos de fusão de membrana que podem ocorrer durante a interação de vesículas lipídicas e a membrana plasmática.). Adaptado de Hammerstedt et al. (1990). 32

Figura 4 – Sequência da capacitação espermática. (A) O bicarbonato pode entrar na célula espermática através dos canais iônicos. O bicarbonato intracelular estimula a AC e a simultânea produção de AMPc ativa a PKA. O efluxo de colesterol pode aumentar a entrada de bicarbonato e afetar a AC. (B) A PKA induz a fosforilação da tirosina (Y) em vários substratos (S). (C) As proteínas espermáticas de ligação à zona pelúcida (ZP) se tornam fosforiladas. (D) PLC do citosol é fosforilada e translocada para a membrana plasmática. (E) Ativação da PKA promove redistribuição e translocação de fosfolipídios. (F) O efluxo de colesterol está envolvido com as mudanças da membrana. (G) A entrada de pequenas quantidades de cálcio nas células espermáticas tem uma função importante na capacitação. (H) Fatores decapacitantes (DF) são removidos da superfície da célula espermática, expondo os receptores de progesterona (Adaptado de: Flesch e Gadella, 2000). 36

Figura 5- Exemplos de motilidade ativada e hiperativada em várias espécies. (Adaptado de Florman e Ducibella, 2006). 38

Figura 6- Sequência da reação acrossômica. (A) as proteínas da zona pelúcida (ZP) se ligam aos receptores espermáticos, promovendo a agregação e a fosforilação da tirosina (Y). (B) O ambiente das ZP contém alta concentração de progesterona, que pode se ligar a um receptor na superfície espermática. Ambos, ZP e a progesterona têm efeito sobre a superfície espermática. (C) pH intracelular aumenta por meio da proteína G e (D) o potencial de membrana despolariza. (E) O aumento do pH e a despolarização da membrana, promovem entrada de cálcio (através de canais de Ca2+ voltagem dependente) (F). O aumento do Ca2+ intracelular ativa a PLC que converte o PIP2 em DAG e IP3 (G) O aumento do Ca2+ ativa a PLA2, que degrada PC em LPC e ácidos graxos livres (FFA). (H) O papel do IP3 não é conhecido, porém, DAG, FFA e LPC ativam uma proteína quinase C (PKC). Essas mudanças são necessárias para a fusão das membranas e secreção de enzimas acrossômicas (Adaptado de: Flesh e Gadella, 2000). 40

Figura 7 - Curva de temperatura no processo de criopreservação do sêmen. Estão representadas as variações de temperatura durante as diferentes etapas do processo de criopreservação. 46

Figura 8 - Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) micrografia de um espermatozoide suíno aprisionado nos canais (matriz) do diluidor concentrado e envolvido por "lagos de gelo" (4000 x) (Adaptado de: Hernández, 2007). 56

Figura 9 – Estrutura da molécula de LDL da gema de ovo. 62

Figura 10 – Fórmula estrutural de uma ciclodextrina (βCD) e observação da estrutura da ciclodextrina na forma de um cone truncado (Fonte: Challa et al., 2005). 67

Figura 11- Principais parâmetros do movimento espermático avaliados pelo CASA. (Fonte: http://www.micropticsl.com/eng/index.html) 72

Figura 12 – Exemplos de modelos de membranas e equipamentos que podem ser utilizados para o processo de diálise para a purificação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema de ovo. (Fonte: http://www.spectrumlabs.com/dialysis/RCsacks.html). 78

Figura 13 – Etapas da extração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema de ovo: A) Após a primeira centrifugação a separação da gema em plasma e grânulos (Pellet); B) Após a diálise, última etapa da purificação, após a última centrifugação ocorre a separação do LDL na forma de um gel flutuante amarelado. 78

Figura 14 - Exemplo de um espermatozoide hiperativado. Tela do programa Edit/Sort do aparelho HTM-IVOS, versão 12.3, Hamilton Thorne. (Fonte: Zaffalon, 2009). 83

Figura 15 – Gráfico de pontos demonstrando a compensação e a formação do gate, onde se encontram os espermatozoides (os pontos em vermelho são partículas do diluidor). O histograma demonstra o pico de fluorescência do Hoescht, e o quadro apresenta as diferentes populações de células para a associação H33342 + PI + FITC-PSA. 84

Figura 16 - Exemplos de gráfico de pontos e tabela de porcentagens originadas pelo citômetro de fluxo. Amostra corada com a associação H33342, PI e FITC-PSA, permitindo a classificação dos espermatozoides bovinos em quatro categorias. 85

Figura 17- Gráfico de pontos (A) gerado pela análise por citometria de fluxo em amostra corada com as sondas C11-BODIPY, H33342 e PI. No gráfico de pontos podem-se observar duas categorias, sendo que o quadrante MPI contém os espermatozoides com a membrana plasmática íntegra, selecionados para a avaliação da intensidade da peroxidação das membranas. O histograma (B) apresenta a população MPI que está sendo analisada quanto à distribuição da fluorescência das células com peroxidação lipídica. O valor obtido é indicado no quadro como a média em unidades arbitrárias (u.a.). 86

Figura 18 - Gráfico de pontos gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostra corada com a associação do H33342, Yo-Pro-1 e Merocianina 540 permitindo a classificação dos espermatozoides bovinos em três categorias. 87

Figura 19 – Esquema Experimental 89

Figura 20 – Gráfico da porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal intactas (AIMPI), em função do tempo de equilíbrio. É possível verificar uma estabilização dos diluidores com CLC a partir de 4h de equilíbrio. 96

Figura 21 – Gráfico da porcentagem de células viáveis com membranas plasmática estável (Meroc (-)), em função do tempo de equilíbrio. 100

Figura 22- Gráfico de pontos gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostras coradas com a associação do H33342, Yo-Pro-1 e Merocianina 540. Comparando os gráficos dos três tempos para o diluidor LDL+CLC é possível visualizar que nos tempos T4 e T6 ocorre um aumento significativo das populações Meroc (-) e redução da população Yo-Pro (+). 100

Figura 23 – Fotos de animais da raça Nelore pertencentes ao plantel da Central de Inseminação Artificial ABS Pecplan que foram utilizados no experimento. Uberaba, MG – 2011. _____ 143

Figura 24 – Método de coleta por vagina artificial como utilizado na rotina da Central de Inseminação Artificial ABS Pecplan. Uberaba, MG – 2011._____ 143

Figura 25 – Entrega do sêmen após a coleta para o laboratório de processamento de sêmen através de janela de amostras própria, minimizando os riscos de contaminação. Uberaba, MG – 2011._____ 143

Figura 26 – Após o recebimento da amostra procedeu-se a análise da concentração espermática das amostras utilizando um espectrofotômetro com diluidor automático de sêmen (Accucell® bovine photometer, Modelo n° 704, IMV Technologies). Laboratório da ABS Pecplan, Uberaba, MG – 2011. _____ 145

Figura 27 – Equipamentos e técnicos do laboratório da Central de Inseminação Artificial Pecplan ABS que auxiliaram na realização do experimento._____ 145

Figura 28 – Fotos dos equipamentos utilizados para a criopreservação do sêmen, em detalhe Máquina de congelamento automatizado (modelo TK-3000® compacta). _____ 147

Figura 29 – Métodos de envase manual das palhetas e avaliação da motilidade visual por meio de microscópio de contraste de fases (avaliação pré e pós-criopreservação). _____ 147

Figura 30 – Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - FMVZ-USP Campus de Pirassununga - SP _____ 147

Figura 31– Fotos do aparelho IVOS (Versão 12.3, Hamilton-Thorne Research) e de colaboradores do experimento. Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - FMVZ-USP Campus de Pirassununga – SP. ___ 149

Figura 32 – Fotos dos equipamentos utilizados nas análises pós-descongelamento. (A) Aparelho de análise computadorizada de sêmen IVOS (Versão 12.3, Hamilton-Thorne Research). (B) Citômetro de fluxo FACSaria (Becktson-Dickeson®, Sunnyvale, CA, USA) _____ 149

Figura 33 – Detalhes do Citômetro de fluxo FACSaria (Becktson-Dickeson®, Sunnyvale, CA, USA). FMVZ-USP Campus de Pirassununga – SP. _____ 149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL microlitro

μM micromolar

μm micrômetro

ACP Agente Crioprotetor Penetrante

AI Acrossoma Intacto

AL Acrossoma Lesado

ALH Amplitude Lateral da Cabeça

AMPc Adenosinamonofosfato cíclico

ANOVA Análise de variância

ATP Adenosinatrifosfato

BCF Freqüência de Batimentos Flagelares

BP filtro *Band Pass*

BSA Albumina Sérica Bovina

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

Ca^{2+} íon cálcio

CASA *Computer-Assisted Semen Analysis* (Análise Computadorizada do Sêmen)

CFDA Diacetato de Carboxifluoresceína

CLC *Cholesterol Loaded Cyclodextrin* (Ciclodextrinas Pré-carregadas com Colesterol)

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido Desoxirribonucléico

DPBS solução tamponada salina de Dulbecco

EthD-1 Homodímero de Etidio-1

EROs espécies reativas de oxigênio

FITC Isotiocianato de fluoresceína

g grama

GOT *Glutamic Oxalacetic Transaminase* (glutamato oxalacético transaminase)

h horas

HDL *High Density Lipoprotein* (Lipoproteína de Alta Densidade)

H258 Hoeschst 33258

H33342 Hoechst 33342

H_2O molécula de água

Hz Hertz

IA Inseminação Artificial

JC-1 Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

K^+ íon potássio

L litro

LDL *Low Density Lipoprotein* (Lipoproteína de Baixa Densidade)

LIN Linearidade

LP Filtro *Long Pass*

mg miligrama

min minuto

mL mililitro

mM milimolar

MPI Membrana Plasmática Intacta

MPL Membrana Plasmática Lesada

MOT Motilidade Total

PROG Motilidade Progressiva

Na^+ íon sódio

nm nanômetro

P nível de significância

pH potencial hidrogeniônico

PI Iodeto de Propídio

PNA Aglutinina de *Arachis hypogea*

PSA Aglutinina de *Pisum sativum*

® marca registrada

R123 Rodamina 123

sptz espermatozoides

STR Retilinearidade

TALP meio de Tyrode suplementado com albumina, lactato e piruvato

TALPm meio de Tyrode suplementado com lactato e piruvato e sem adição de CaCl $2H_2O$ e $NaHCO_3$

VAP Velocidade do trajeto

VCL Velocidade curvilinear

VSL Velocidade progressiva

Tempo de equilíbrio, lipoproteínas de baixa densidade e colesterol na criopreservação do sêmen bovino

RESUMO

O colesterol desempenha papéis importantes em várias funções espermáticas, incluindo efeitos sobre as propriedades da membrana. Um desses efeitos é o de estabilizar as membranas a baixas temperaturas. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da associação do colesterol (Ciclodextrinas Carregadas com Colesterol - CLC) e das Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) e das possíveis interações entre estes agentes crioprotetores e o tempo de equilíbrio, durante o processo de criopreservação, sobre a motilidade espermática, integridade, estabilidade e na peroxidação lipídica das membranas espermáticas pós-descongelamento. Foram utilizadas amostras de sêmen de 15 touros Nelore, andrologicamente normais, com idades de 2 a 6 anos, coletadas por vagina artificial e avaliadas segundo as normas do CBRA (1998). As amostras foram divididas em 4 alíquotas e diluídas a 32ºC (30 x 10^6 sptz/mL) com os seguintes diluidores: 1) Tris-Gema (controle); 2) LDL (8%); 3) LDL $^{+ CLC}$ (8% LDL + CLC); 4) L-CLC (0,8% LDL + CLC). O sêmen diluído foi resfriado até a temperatura ambiente (25ºC) e envasado em palhetas de 0,5 mL. Para a criopreservação utilizaram-se três aparelhos automatizados (TK-3000®), com as mesmas curvas de resfriamento (-0,25°C/min) e de congelamento (-20°C/min) para todos os tratamentos, variando apenas o tempo de equilíbrio a 5ºC: 0h (T0), 4h (T4), e 6h (T6) totalizando doze tratamentos. Após o congelamento, as palhetas foram armazenadas em N_2 líquido (-196 ºC). As avaliações do sêmen após descongelamento consistiram na análise computadorizada da motilidade espermática (CASA) e nas análises pela citometria de fluxo quanto à integridade das membranas plasmática e 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). Os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0) apresentaram os menores valores, tanto para as motilidades total (MOT) e progressiva (PROG), quanto para a integridade das membranas plasmática e acrossomal (AIMPI), para todos os diluidores. O diluidor LDL (8%) apresentou a melhor atividade crioprotetora em todos os tempos, com maiores motilidade total e progressiva, melhores características do movimento espermático (alto VAP, VSL e VCL), maior porcentagem de células rápidas (Rapid), a maior integridade das membranas plasmática e acrossomal, e a maior proporção de células viáveis não capacitadas (Meroc (-)). O diluidor a base de gema apresentou a melhor proteção contra a peroxidação lipídica das membranas espermáticas. O diluidor L-CLC apresentou a pior atividade crioprotetora. A adição de colesterol através do pré-tratamento do sêmen com CLC não permitiu uma redução do tempo de equilíbrio. Além disso, a adição de CLC à diluidores a base de LDL purificado a 8%, reduziu a sobrevivência espermática em T0 e T6. O tempo de 4 h de equilíbrio foi adequado para se obter uma alta sobrevivência espermática, independente do diluidor utilizado, porém, os diluidores Gema e LDL se beneficiaram de um maior tempo de equilíbrio (6h). O melhor método de criopreservação foi aquele que utilizou o diluidor LDL (8%) e 6h de equilíbrio (LDL-T6). Concluiu-se que o tempo de equilíbrio é necessário no processo de criopreservação do sêmen bovino para preservação da motilidade e da integridade das membranas espermáticas, independente do diluidor utilizado. Além disso, conclui-se que a CLC sozinha ou associada a baixas concentrações de LDL não protegem adequadamente as membranas espermáticas dos efeitos lesivos da criopreservação.

Palavras-chave: colesterol, criopreservação de sêmen, lipoproteína de baixa densidade, metil-β-ciclodextrina, tempo de equilíbrio.

Equilibration time, low density lipoproteins and cholesterol on bovine semen cryopreservation

ABSTRACT

Cholesterol plays important roles in many sperm functions, including effects on membrane properties. One of these effects is to stabilize membranes at low temperatures. The aim of this study was to evaluate the association of Cholesterol (Cholesterol Loaded Cyclodextrin - CLC) and Low Density Lipoproteins (LDL) and possible interactions between these cryoprotective agents and equilibration time, during the process of cryopreservation, on post-thawing sperm motility, integrity, stability and lipid peroxidation of sperm membranes. Semen samples from 15 Nellore bulls, andrologicaly normal, 2-6 years old, were collected by artificial vagina and evaluated according to the standards of CBRA (1998). Each semen sample was divided into 4 aliquots and diluted at 32º C (30 x 10^6 sperms /mL) with the following extenders: 1) Tris-Egg-Yolk (control); 2) LDL (8%); 3) LDL $^{+ CLC}$ (8% LDL + CLC); 4) L-CLC (0,8% LDL + CLC).
After dilution, the extended semen was cooled to room temperature (25ºC) and packaged in 0.5 mL straws. For cryopreservation three automated machines were used (TK-3000®), with the same cooling (-0.25° C / min) and of freezing rates (- 20°C / min) for all treatments, varying only the equilibration time at 5ºC: 0h (T0), 4h (T4), and 6h (T6) for a total of twelve treatments. Thereafter, the straws were transferred to liquid nitrogen (−196 ◦C) for storage.Semen evaluations after thawing were performed with Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) and flow cytometry for integrity of plasma and acrosomal membranes (PI/FITC-PSA/H33342), lipid peroxidation (PI/C11-BODIPY581/591/H33342) and sperm capacitation by plasma membrane stability (Merocianina 540/Yo-Pro1/H33342). The control treatments (0 h equilibration) had the lowest values for both total (MOT) and progressive motilities (PROG), as well as for percentage of sperm with intact plasma and acrosomal membranes (IPIA), for all extenders. The extender LDL (8%) provided the best cryoprotective action at all times, with the highest total and progressive motilities, better sperm movement characteristics (highest VAP, VSL and VCL), highest percentage of rapid cells (Rapid), the highest integrity of plasma and acrosomal membranes, and the highest proportion viable non-capacitated cells (Meroc (-)). The Egg-Yolk based extender provided the best protection against lipid peroxidation of sperm membranes. The extender L-CLC had the worst cryoprotective activity. Addition of cholesterol by pretreatment of semen with CLC did not allow a reduction in duration of equilibration time. Furthermore, the addition of CLC to purified LDL(8%) based extenders, reduced the sperm survival at T0 and T6. Equilibration for 4 h was suitable to achieve a high sperm survival, regardless of extender used, however, the Tris-Egg-Yolk and LDL extenders were benefited from a greater equilibriation time (6h). Overall, the best cryopreservation method was the combination of LDL (8%) extender and 6h of equilibration (LDL-T6). In conclusion, equilibration time is necessary in the process of cryopreservation of bovine semen for preservation of motility and integrity of sperm membranes, regardless of extender used. Furthermore, CLC alone or combined with low concentrations of LDL do not adequately protect sperm membranes from the detrimental effects of cryopreservation.

Keywords: cholesterol, semen cryopreservation, low density lipoprotein, methyl-β-cyclodextrin, equilibration time.

1 INTRODUÇÃO

A pecuária no Brasil é uma atividade de grande importância para a economia, sendo inegável a participação do setor agropecuário para o equilíbrio da balança comercial do Brasil. O aumento da produtividade na pecuária nacional pode ser obtido com o emprego de biotecnologias que otimizem o sistema de produção, buscando maior produção por hectare e assim diminuindo os custos de produção. A utilização de biotecnologias aplicadas à reprodução permite maximizar o uso de genética superior, possibilitando o aumento da produtividade (Celeghini, 2005; Leite, 2008).

Várias biotécnicas reprodutivas são utilizadas no Brasil, porém, a mais utilizada é a inseminação artificial (IA). A inseminação artificial com sêmen criopreservado é uma biotecnologia reprodutiva de custos mais acessíveis e que serve como ferramenta para o melhoramento genético dos rebanhos. Todavia, para sua aplicação ampla é indispensável o uso do sêmen criopreservado. Desta forma, a criopreservação do espermatozoide tornou-se um procedimento essencial para a aplicação desta biotecnologia (Parks, 1997; Celeghini, 2005; Leite, 2008; Zaffalon, 2009).

Um dos objetivos da indústria de sêmen criopreservado é reduzir o número de espermatozoides em cada dose inseminante, para que mais doses possam ser produzidas a partir de cada ejaculado, porém mantendo uma alta fertilidade (Vishwanath e Shannon, 2000). Esse objetivo só pode ser alcançado melhorando a taxa de sobrevivência celular na criopreservação (Mocé et al., 2010a).

As taxas de sobrevivência espermática pós-criopreservação não são ótimas para a maioria das espécies (Leibo e Bradley, 1999; Watson, 2000b; Mocé et al., 2010a). Portanto, novas estratégias de criopreservação são necessárias para aumentar o número de espermatozoides vivos e a qualidade destes pós-descongelamento. O colesterol desempenha papéis importantes em várias funções espermáticas, incluindo efeitos sobre as propriedades da membrana. Um desses efeitos é o de estabilizar as membranas a baixas temperaturas. Assim, espécies que produzem espermatozoides com alta proporção colesterol: fosfolipídios na membrana são mais resistentes ao choque frio (cold shock) do que espermatozoides com baixa proporção colesterol: fosfolipídios (Darin-Bennett e White, 1977; Parks e Lynch, 1992; Parks e Graham, 1992; Holt, 2000a). A alteração da composição lipídica da membrana plasmática de espermatozoides afeta a sobrevivência espermática na criopreservação. Portanto, aumentar o teor de colesterol da membrana plasmática pode ser uma estratégia que pode melhorar a qualidade dos espermatozoides pós-descongelamento (Mocé et al., 2010a).

Vários estudos (Combes et al., 2000; Purdy e Graham, 2004a,b; Mocé et al., 2010a,b; Oliveira et al., 2010) relatam que a inclusão de colesterol, por meio das ciclodextrinas pré-carregadas com colesterol (CLC), como alternativa para aumentar a estabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides de várias espécies durante o resfriamento, e assim, melhorar a qualidade pós-descongelamento do sêmen. Em bovinos, o tratamento do sêmen com CLC antes da criopreservação aumentou significativamente a taxa de sobrevivência espermática (Purdy e Graham, 2004a,b; Mocé e Graham, 2006; Amorim et al., 2009).

Associado a isto, existe uma demanda crescente para a substituição da gema de ovo nos diluidores de sêmen devido ao risco sanitário envolvido (Bousseau et al. 1998; Vishwanath e Shannon, 2000; Aires, 2003) e à presença de substâncias na gema que inibem a respiração dos espermatozoides ou

diminuem a sua motilidade (Pace e Graham, 1974; Moussa et al., 2002). Portanto, seria de grande benefício a retirada dessas substâncias prejudiciais e a adição apenas do agente crioprotetor da gema de ovo, a LDL (Moussa et al., 2002). Estudos demonstraram que a utilização das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) purificadas como substituto da gema pode ser uma excelente alternativa para a preparação de meios quimicamente definidos, apresentando vantagens em relação à qualidade e fertilidade do sêmen criopreservado (Moussa et al., 2002; Amirat et al., 2004; Amirat et al., 2005). Contudo, não existem estudos da associação das CLC e da LDL na preparação de meios diluidores, e sobre suas possíveis interações com outros fatores da criopreservação, como o tempo de equilíbrio.

Os protocolos de criopreservação de sêmen bovino geralmente incluem resfriamento lento até 4-5ºC, seguido por um intervalo variável de equilíbrio (de 30 min a 24 h) a esta temperatura antes do congelamento. Normalmente, o glicerol é adicionado durante esse intervalo (Vishwanath e Shannon, 2000). Na literatura não existe um consenso quanto à necessidade e duração do equilíbrio. Além disso, existe o desejo de se reduzir ou eliminar essa etapa, acelerando assim o processo de criopreservação (Dhami et al, 1992; Leite et al., 2010). Porém, recentemente Leite et al. (2010), utilizando sistema CASA e citometria de fluxo, concluíram que o tempo de equilíbrio é necessário para a preservação da motilidade e integridade das membranas espermáticas.

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da associação da CLC e da LDL e das interações entre estes agentes crioprotetores e o tempo de equilíbrio, durante o processo de criopreservação, sobre a motilidade espermática, integridade, estabilidade, e peroxidação lipídica das membranas espermáticas. Essa pesquisa visou a obteção de conhecimentos que permitam o desenvolvimento de protocolos de criopreservação mais eficazes, utilizando meios quimicamente definidos, para aumentar a sobrevivência espermática.

2 HIPÓTESES:

1 - O tempo de equilíbrio é necessário na criopreservação do sêmen bovino pré-tratado com Ciclodextrinas Carregadas com Colesterol (CLC) para a preservação da motilidade, integridade, estabilidade e intensidade de peroxidação das membranas espermáticas.

2 - Diluidores contendo a associação de colesterol (CLC) e LDL necessitam de menor tempo de equilíbrio para preservar a motilidade, a integridade e função das membranas espermáticas pós-descongelamento em relação à diluidores que contém apenas uma dessas substâncias.

3 – Diluidores contendo a associação de CLC e LDL reduzem a peroxidação dos lipídios da membrana espermática e diminuem a hiperativação espermática no processo de criopreservação.

4 - A associação de CLC e LDL possui melhor efeito crioprotetor sobre as variáveis espermáticas do que diluidores que contém apenas uma dessas substâncias.

5 - Existem interações entre os diluidores contendo LDL e/ou colesterol e o tempo de equilíbrio que influenciam a sobrevivência espermática na criopreservação do sêmen bovino.

3 OBJETIVOS:

1 - Analisar o efeito do tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen bovino pré-tratado com Ciclodextrinas carregadas com colesterol (CLC), sobre a motilidade, integridade, peroxidação e estabilidade das membranas espermáticas.

2 - Avaliar se a associação entre colesterol e LDL na formulação de diluidores permite a redução do tempo de equilíbrio em relação à diluidores que contém apenas uma dessas substâncias, preservando a motilidade, a integridade e função das membranas espermáticas.

3 – Avaliar o efeito da associação de CLC e LDL sobre a peroxidação lipídica da membrana espermática e sobre a hiperativação espermática no processo de criopreservação.

4 - Verificar se a associação de colesterol e LDL na formulação do diluidor possui melhor efeito crioprotetor das variáveis pós-descongelamento do que diluidores que contém apenas uma dessas substâncias.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O espermatozoide bovino

O sêmen é a suspensão celular líquida contendo espermatozoides (gametas masculinos) e secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino. A porção fluida dessa suspensão, que é formada na ejaculação, é conhecida como plasma seminal (Garner e Hafez, 2004).

A espermatogênese inicia-se nos mamíferos na puberdade e é a soma total dos eventos que ocorrem dentro dos túbulos seminíferos nos testículos que levam à produção de espermatozoides. A espermatogênese pode ser dividida em três fases: 1) Espermatocitogênese (mitose); 2) Meiose; e 3) Espermiogênese. Neste processo a espermatogônia se divide, através de sucessivas mitoses, e produz o espermatócito primário que passa pela primeira divisão meiótica originando o espermatócito secundário. O espermatócito secundário, por sua vez, passa pela segunda divisão meiótica para produzir espermátides haploides que se diferenciam em espermatozoides. Em bovinos este processo tem uma duração de aproximadamente 61 dias (Barth e Oko, 1989; Flesch e Gadella, 2000; Johnson et al., 2000; Zaffalon, 2009).

Na maioria das espécies mamíferas as células espermáticas estão totalmente maturadas quando atingem a cauda do epidídimo (Flesch e Gadella, 2000; Johnson et al., 2000). No epidídimo, o espermatozoide adquire o potencial de motilidade pela ação das secreções das células epiteliais e constituintes dos fluidos luminais (Lamirande et al., 1997; Zaffalon, 2009).

O espermatozoide é revestido inteiramente por uma membrana plasmática e parcialmente por uma membrana denominada acrossomal. Apresenta-se subdividido em cabeça, colo e cauda (Figura 1). O espermatozoide é uma célula alongada com cabeça achatada e larga contendo o núcleo espermático, e uma cauda contendo os componentes necessários para a motilidade celular. O acrossoma é uma estrutura de membrana dupla situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo. O colo conecta a cabeça do espermatozoide com a cauda, a qual é subdividida em peça intermediária, principal e terminal (Barth e Oko, 1989; Mortimer, 1997; Eddy e O'Brien, 1994; Garner e Hafez, 2004; Leite, 2008).

Toda a característica estrutural do espermatozoide está voltada para a sua atividade funcional única: assegurar a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozoide para o oócito, onde ocorre a fusão dos pronúcleos masculino e feminino produzindo o zigoto (Eddy e O'Brien, 1994).

As características estruturais da cabeça e da cauda do espermatozoide refletem os seus papéis funcionais. A principal função da cabeça do espermatozoide é liberar um conjunto haplóide de cromossomos para o

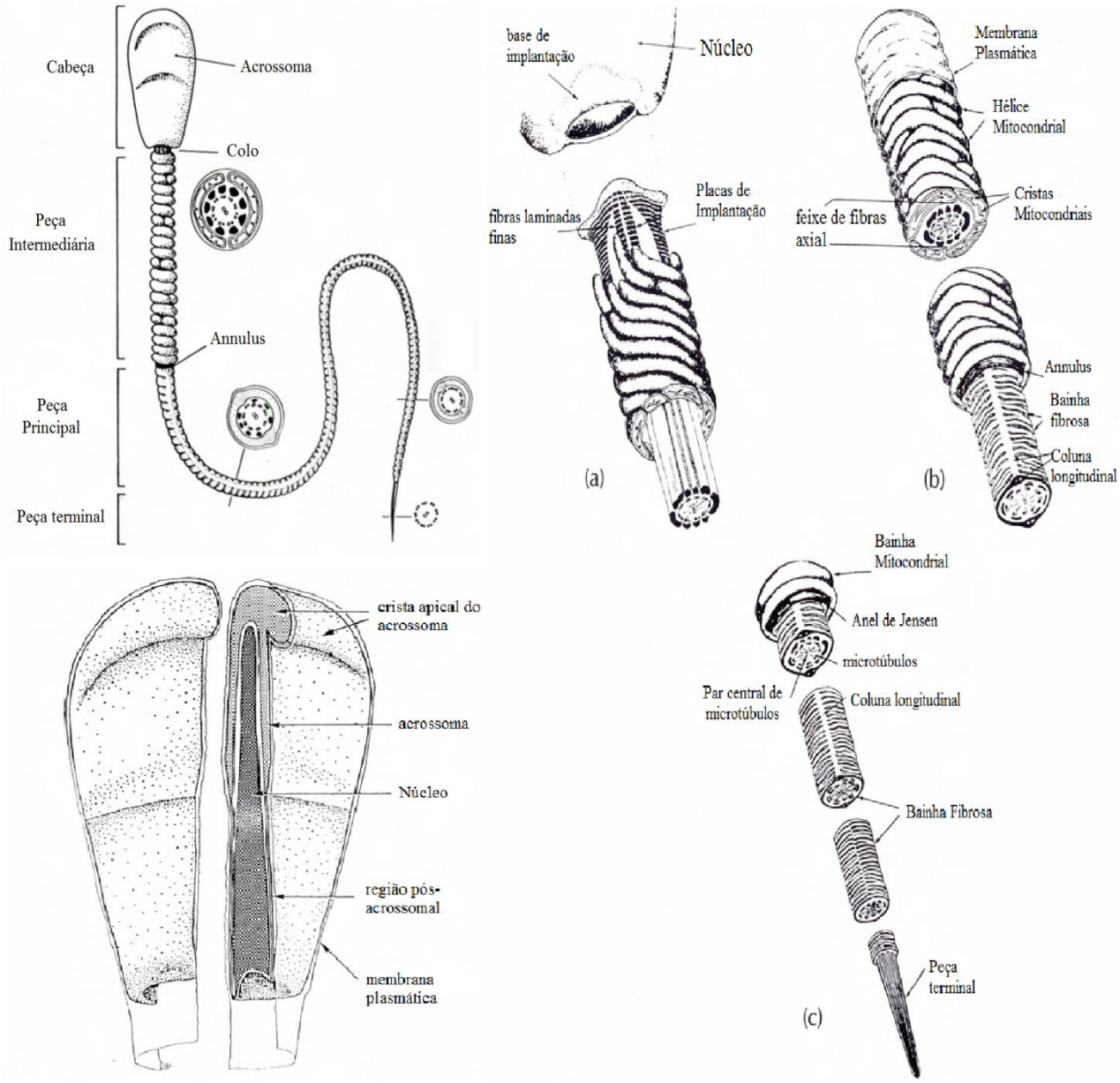


Figura 1 – Ilustração sumarizando as principais características estruturais do espermatozoide bovino. Detalhes da ultraestrutura da cabeça e da cauda do espermatozoide. (a) região do colo; (b) região da peça intermediária; (c) regiões da peça principal e peça terminal (Adaptado de Barth e Oko, 1989).

oócito. A função do flagelo é promover motilidade à célula para permitir a sua passagem pelo trato genital feminino e a penetração através da zona pelúcida do oócito. (Mortimer, 1997).

A cabeça do espermatozoide possui o núcleo, o acrossomo e pequena quantidade de estruturas do citoesqueleto e citoplasma. O núcleo do espermatozoide apresenta a sua cromatina altamente compactada, e é responsável por um terço do peso do espermatozoide. A cromatina nuclear apresenta como principais componentes o DNA e proteínas. As proteínas, que constituem a cromatina do espermatozoide, são conhecidas coletivamente como *histonas espermáticas*, e estabilizam o DNA nuclear

conjugando-se com o mesmo através de ligações sulfídricas (Barth e Oko, 1989; Garner e Hafez, 2004; Leite, 2008).

O acrossoma é uma organela derivada do complexo de Golgi e é formada durante o estágio inicial da espermiogênese. Esta organela se dispõe sobre o núcleo como uma capa sobre a porção anterior da cabeça do espermatozoide. Ela contém várias enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração da matriz extracelular do oócito (zona pelúcida) para que ocorra a fertilização (Flesch e Gadella, 2000; Ashizawa et al., 2004; Garner e Hafez, 2004). Nessa organela distinguem-se duas membranas: a membrana acrossomal externa e membrana acrossomal interna. A membrana acrossomal interna fica em contato com a membrana nuclear; enquanto a membrana acrossomal externa está em contato com a face interna da membrana plasmática. O acrossoma consiste de dois segmentos, a capa acrossomal (acrossomo anterior) e o segmento equatorial (acrossomo posterior). Durante a reação acrossômica, a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática se fundem e formam vesículas, ocorrendo a liberação das enzimas e outros componentes da matriz acrossomal. A membrana acrossomal interna e o segmento equatorial persistem até a fusão do espermatozoide com o oócito (Eddy E O'brien, 1994; Flesch e Gadella, 2000; Ashizawa et al., 2004). Esta fusão ocorre entre a membrana plasmática remanescente do segmento equatorial do espermatozoide e a membrana plasmática do oócito (Flesch e Gadella, 2000; Garner e Hafez, 2004; Leite, 2008).

O flagelo é constituído internamente pelo axonema, uma estrutura especializada do citoesqueleto, responsável pela motilidade espermática. O axonema é formado por um anel de nove microtúbulos duplos envolvendo um par central. As dineínas e nexinas realizam a ligação entre os pares de microtúbulos. As dineínas apresentam projeções chamadas braços de dineína, que são responsáveis pela geração da força motora do flagelo. A dineína é um complexo de multissubunidades de ATPase que convertem a energia química (ATP) em energia cinética, permitindo que pares de microtúbulos adjacentes deslizem um sobre o outro, causando uma curvatura do axonema e então o movimento flagelar (Barth e Oko, 1989; Mortimer, 1997; Turner, 2006).

Externamente ao axonema, o flagelo possui nove fibras densas, cada uma associada a um microtúbulo duplo. Cada uma dessas fibras possui um córtex e uma medula e é constituída por uma proteína semelhante à queratina, o que confere elasticidade ao flagelo (Barth e Oko, 1989; Eddy e O'Brien, 1994; Mortimer, 1997; Turner, 2006).

A peça intermediária se estende do colo até o anulus, onde se conecta com a peça principal. É caracterizada pela presença de nove fibras densas próximas a cada um dos pares de microtúbulos e por uma bainha de mitocôndrias em um arranjo helicoidal que envolve as fibras densas e o axonema (Barth e Oko, 1989; Mortimer, 1997; Turner, 2006).

A peça principal do flagelo se estende do anulus até a peça terminal e é caracterizada pela presença da bainha fibrosa, uma estrutura do citoesqueleto que rodeia o axonema e as fibras densas externas, fornecendo um suporte no controle e restrição do movimento flagelar. Já a peça terminal é formada apenas pelo axonema, que é coberto pela membrana plasmática (Eddy e O'Brien, 1994; Mortimer, 1997; Turner, 2006).

A função fisiológica das mitocôndrias nas células é realizar a fosforilação oxidativa e produzir o ATP como fonte de energia metabólica. A membrana mitocondrial interna é o local de produção de energia, e a posição das mitocôndrias ao redor da porção proximal do axonema sugere que elas são necessárias para o suprimento de ATP usado

para a motilidade flagelar (Mortimer, 1997, Leite, 2008).

Entretanto, em adição ao seu papel de sustentação estrutural, a bainha fibrosa possivelmente desempenhe um papel mais direto na regulação da motilidade do flagelo devido ao crescente número de proteínas envolvidas nas vias de sinalização da motilidade e no metabolismo, que foram localizadas na bainha fibrosa (Turner, 2006).

Contudo, a importância das mitocôndrias para a motilidade espermática foi reconsiderada recentemente. Alguns estudos sugerem que o espermatozoide produz a maior parte do ATP necessário para o movimento flagelar por glicólise (produção anaeróbia de ATP) (veja Turner, 2006). Estes estudos supõem que a glicólise na peça principal, e não necessariamente a fosforilação oxidativa na peça intermediária, seja o fator crítico para o funcionamento normal da célula espermática de mamíferos (Turner, 2006).

Porém, Ford (2006) forneceu algumas evidências do contrário. Segundo este autor, a glicólise local pode fornecer energia ao flagelo distal, mas as evidências de que ela é imprescindível para a motilidade são fracas. Em primeiro lugar, é provável que a difusão, reforçada pela adenilato-quinase e outras lançadeiras, seja suficiente para a troca de ATP, ADP e Pi (fosfato inorgânico) entre o flagelo e as mitocôndrias na peça intermediária na taxa necessária para manter a motilidade. Em segundo lugar, as experiências com o inibidor das GAPDHs (gliceraldeido-3-fosfato dehidrogenases), a α-cloroidrina, indicam que o espermatoizóide pode manter a motilidade por longos períodos quando a glicólise é bloqueada, desde que altas concentrações de intermediários glicolíticos não se acumulem. Isto deve ser tomado em conta na interpretação dos resultados em camundongos "knock-out" para GAPDH. Em terceiro lugar, os espermatozoides da maioria das espécies podem permanecer totalmente móveis em meios sem açúcar, especialmente se substratos mitocondriais são fornecidos, e com a exceção do cão, evidência de gliconeogênese para fornecer substrato para o flagelo distal estão ausentes ou são fracas.

4.1.1 As membranas do espermatozoide

As várias membranas (plasmática, nuclear, acrossomal e mitocondrial) da célula espermática são agregados especiais de lipídeos e proteínas, organizados durante a espermatogênese e modificados durante o trânsito epididimário, armazenamento e ejaculação. A função da membrana é determinada pelas interações dos vários componentes, e qualquer evento de processamento que altere estas interações pode levar a alterações da função. O desenvolvimento de um protocolo de criopreservação deve começar com uma apreciação da estrutura da membrana e, em seguida, incorporar medidas que minimizem alterações (Hammerstedt et al., 1990). Portanto, o conhecimento da membrana plasmática é o ponto inicial para o êxito nos processos de manipulação de sêmen (Valle e Silva Filho, 2001).

Apesar de diferenças funcionais, a estrutura básica das membranas biológicas segue o modelo proposto por Singer e Nicholson (1972). As membranas da célula espermática são formadas por uma bicamada de lipídeos anfipáticos que contém proteínas integrais e periféricas incrustadas nesta bicamada ou associadas a ela, organizadas como um "mosaico fluido" (Figura 2) (Parks e Graham,1992; Parks, 1997; Valle e Silva Filho, 2001).

A composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides de várias espécies de mamíferos já foi elucidada.

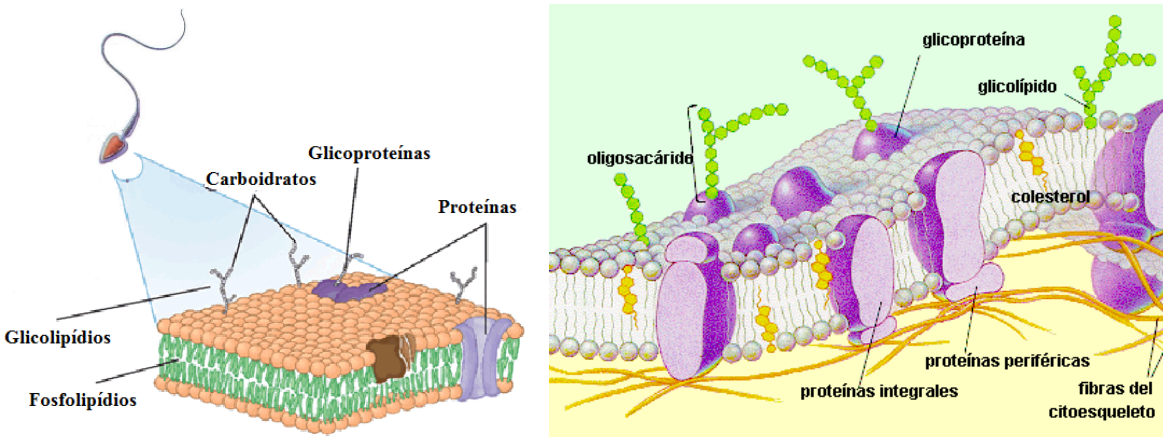


Figura 2 - Organização da membrana plasmática; modelo "mosaico fluido" de Singer e Nicholson (1972). (Adaptado de: http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia/cito5.php)

Embora exista uma considerável variação entre diferentes espécies de mamíferos, em geral a membrana plasmática contém aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios (em base molar). Os fosfolipídios podem ser divididos em fosfoglicerolipídios (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, cardiolipina e fosfatidilinositol) e esfingomielina. Os lipídios neutros incluem o colesterol e pequena quantidade de desmosterol, sulfato de colesterol e éster colesteril. Os glicolipídios encontrados na célula espermática são seminolipídios e traços de outros glicolipídios (Flesch e Gadella, 2000; Celeghini, 2005).

Os fosfolipídios possuem um grupo polar ou hidrofílico denominado de cabeça e uma ou duas cadeias de ácidos graxos (hidrofóbicas) que se estendem para o interior da membrana. A maioria desses lipídeos tende a formar espontaneamente uma configuração de bicamada quando em meio aquoso (Parks, 1997; Valle e Silva Filho, 2001). Esse arranjo lamelar promove uma barreira hidrofóbica seletiva na qual a água e moléculas dissolvidas nela passem apenas com dificuldade. Consequentemente, o transporte efetivo de moléculas é feito através de canais ou poros formados pelas proteínas, existindo pouco ou nenhum transporte de moléculas hidrofílicas em regiões da membrana sem poros ou canais. Mudanças na conformação da membrana, que podem ser ocasionadas pelo resfriamento, e que resultam em arranjos anormais dos fosfolipídeos e proteínas, permitem rápida passagem de moléculas que normalmente passariam vagarosamente através da membrana (Amann e Pickett, 1987; Valle e Silva Filho, 2001; citados por Leite, 2008).

As proteínas integrais podem atuar como poros ou canais na membrana, ou podem atuar como receptores de outras moléculas. Muitas proteínas integrais e periféricas possuem, aderidas a sua superfície, cadeias de carboidratos carregados negativamente, que atraem proteínas e glicoproteínas do meio externo. Esses elementos formam um glicocálix na superfície espermática, exercendo função primordial na interação entre essa célula e o oócito (Amann e Pickett, 1987; Valle e Silva Filho, 2001).

Atualmente o modelo do mosaico fluido tornou-se mais complexo incluindo conceitos mais recentes, tais como: a distribuição lipídica, a assimetria de bicamada, polimorfismo dos lipídios e interações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína (Parks e Graham,1992; Parks, 1997). Essas interações complexas levam à formação de

domínios dentro do plano da membrana, resultando em compartimentalização da membrana plasmática. Essa compartimentalização é observada na membrana plasmática do espermatozoide, por exemplo, nas diferenças de distribuição de lipídios e proteínas entre as regiões periacrossomal e pós-acrossomal da cabeça do espermatozoide, da peça intermediária e da peça principal do flagelo. O que é surpreendente é que estes domínios de membrana são mantidos na membrana fluida apesar de esta permitir a difusão lateral dos lipídios (Amann e Pickett, 1987; Parks e Graham,1992; citados por Leite, 2008).

Assim como a composição específica de aminoácidos e a sequência determina a estrutura terciária, e consequentente a função de uma proteína, uma composição lipídica específica também pode determinar a formação de domínios de membrana e suas funções. A compartimentalização da membrana é uma combinação de muitos fatores, incluindo: 1) as interações lipídio-lipídio que inibem a difusão lateral dos lipídios em interação; 2) a imobilização lipídica devido às interações com proteínas que estão ancorados ao citoesqueleto; 3) as barreiras proteicas à difusão intrarregional devido a partículas intramembranosas estacionárias, que se acreditam serem grandes proteínas integrais de membrana, e 4) solubilidade seletiva de lipídios e proteínas dentro dos lipídios que compõem o compartimento da membrana (Parks e Graham, 1992).

Além da organização lateral da membrana plasmática, a compartimentalização vertical também resulta das diferenças de composição entre os dois folhetos da membrana, denominada assimetria da membrana. Lipídios com uma carga neutra ou positiva, como a fosfatidilcolina, a esfingomielina, e os glicoesfingolipídios localizam-se preferencialmente no folheto externo, enquanto os fosfolipídios aniônicos como a fosfatidiletanolamina, a fosfatidilserina e o fosfatidilinositol situam-se na porção interna da bicamada (Hammerstedt et al., 1990; Parks e Graham,1992; Parks, 1997; Flesch e Gadella, 2000). Esta assimetria transversal, possivelmente é devido ao transporte ativo pela enzima aminofosfolipide-translocase, sendo que a alteração da assimetria seria responsável pelo aumento da fluidez do folheto externo da membrana durante a capacitação (Flesch e Gadella, 2000; citado por Leite, 2008).

Nos mamíferos, o espermatozoide ejaculado possui uma morfologia altamente diferenciada, que se reflete na sua superfície. A cabeça do espermatozoide, a peça intermediária e o restante da cauda são divididos pelo anel posterior e a estrutura do anulus, respectivamente. Estas estruturas supostamente funcionam como uma espécie de barreira juncional para as trocas lipídicas entre a cabeça e a peça intermediária e desta com a cauda. A superfície da cabeça do espermatozoide possui heterogeneidade de distribuição lateral onde podem ser identificadas no mínimo quatro regiões: a área apical, a área pré-equatorial, a equatorial e a pós-equatorial. Lembrando que a cabeça do espermatozoide não contém barreiras juncionais para manter estas regiões, e que poderiam explicar esta separação em áreas que contém determinadas proteínas e lipídios (Flesch e Gadella, 2000; Gadella et al., 2008; Andrade, 2009).

Uma explicação mais provável para a heterogeneidade lateral nessa membrana é fornecida pelas interações eletrostáticas diferenciais existentes entre os componentes da membrana e o glicocálice polarizado. Um forte indício para a validade deste modelo é o fato que a capacitação induz remodelação do glicocálice que explica as alterações dinâmicas na topologia lateral das proteínas de transmembrana. Além disso, o glicocálix pode induzir mudanças de distribuição lateral dos lipídios na membrana plasmática

dos espermatozoides que por sua vez podem induzir rearranjos das proteínas de transmembrana livres (Flesch e Gadella, 2000; Gadella et al., 2008).

Dentro de um compartimento de membrana, os lipídios normalmente são miscíveis e apresentam liberdade de movimentação lateral, o que permite que a membrana seja fluida à temperatura corporal (Amann e Pickett, 1987; Parks e Graham,1992).

Nas membranas, existe uma categoria de fosfolipídios que apresentam cadeias de ácidos graxos poli-insaturados, fazendo com que eles assumam uma forma cônica, onde a base é a extremidade hidrofóbica da molécula. Devido a esta forma cônica esses fosfolipídios tendem a formar uma micela invertida, ou forma "hexagonal II", onde as extremidades hidrofóbicas são externas (base dos cones) e as hidrofílicas internas, ao contrário de uma micela clássica na qual as extremidades hidrofóbicas privam-se do contato com a água (Figura 3) (Parks e Graham, 1992; Valle e Silva Filho, 2001).

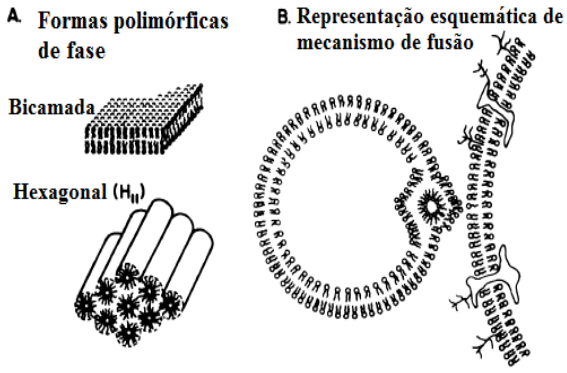


Figura 3 - Representação esquemática de formas polimórficas de fase observadas nas membranas biológicas. Duas formas polimórficas de fase estão presentes nas membranas das células (painel da esquerda). A forma de bicamada é a mais prevalente; e a forma hexagonal II é muito rara. No painel da direita, o possível papel para a forma hexagonal II (eventos de fusão de membrana que podem ocorrer durante a interação de vesículas lipídicas e a membrana plasmática.). Adaptado de Hammerstedt et al. (1990).

O arranjo hexagonal não promove uma barreira de permeabilidade e provavelmente apenas ocorre transitoriamente em membranas biológicas durante os eventos de fusão de membranas (Hammerstedt et al., 1990; Parks e Graham, 1992). Em condições fisiológicas estes fosfolipídios localizam-se ao redor das proteínas integrais da membrana e esta interação evita a ocorrência da forma "hexagonal II", devido às interações proteína-lipídio e ao impedimento físico exercido por essas proteínas (Parks e Graham, 1992; Valle e Silva Filho, 2001).

Segundo Quinn (1985, 1989), esses fosfolipídios formadores de micela invertida (*nonbilayer lipids*) possuem maior ponto de fusão e, por isso, quando a membrana é submetida a resfriamento, estes lipídeos são os primeiros a sofrerem uma transição de fase termotrópica (citado por Parks e Graham, 1992; Parks, 1997). Esses fosfolipídios sofrem mudança da fase líquido-cristalina para a fase gel e então se agregam em microdomínios, enquanto os outros lipídeos e as proteínas permanecem fluidos em regiões onde ainda não ocorreu a mudança de fase. Embora este rearranjo provavelmente não afete a membrana em temperaturas baixas, quando ocorre o reaquecimento, os fosfolipídios poli-insaturados formadores de micela invertida agregados podem desestabilizar a membrana e permitir a ocorrência da forma hexagonal II, resultando em perturbação localizada da membrana e perda da integridade da membrana. Isto leva a formação de canais hidrofílicos na membrana que permitem a passagem de íons e pequenas moléculas, o que leva a perda do controle osmótico (Parks e Graham, 1992; Parks, 1997; Valle e Silva Filho, 2001). Além disso, podem ocorrer alterações nas interações lipídio-proteína dentro da membrana se os lipídios formadores de micela invertida não puderem restabelecer suas associações originais com as proteínas, possivelmente levando a alteração da função das proteínas (Parks e Graham, 1992).

A membrana plasmática apresenta-se em estado de fluidez, na temperatura corpórea, sendo esta característica um pré-requisito para o desempenho de suas funções. Os principais fatores que determinam a fluidez geral de uma membrana são a proporção de colesterol: fosfolipídios, a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados que compõem os fosfolipídios, e a temperatura à qual a membrana é exposta (Amann e Pickett, 1987; Hammerstedt et al., 1990; Leite, 2008).

O colesterol é o principal esterol presente nos espermatozoides e nas membranas celulares dos mamíferos, e possui o papel de modular a fluidez e a estabilidade da bicamada lipídica através da sua interação estérica com os fosfolipídios de membrana (Parks e Graham, 1992; Parks, 1997). Em geral, quanto maior a quantidade de colesterol presente, menos flexível, ou menos fluida é aquela porção da membrana (Amann e Pickett, 1987).

Vários estudos demonstraram a existência de diferenças de resistência dos espermatozoides de diferentes espécies ao choque-frio (cold shock). A sensibilidade dos espermatozoides aos danos do "cold shock" é determinada pela composição fosfolipídica da membrana e pela relação colesterol: fosfolipídios da membrana (Holt, 2000a). Em geral, espécies cujos espermatozoides possuem alta relação colesterol: fosfolipídios (coelho e homem) são mais resistentes aos danos do choque-frio do que os espermatozoides que possuem baixa relação colesterol: fosfolipídios (garanhão, carneiro e touro) (Tabela 1) (Darin-Bennett e White, 1977; Watson, 1981a; Parks e Lynch, 1992; Parks e Graham, 1992; Mocé et al., 2010a). A proporção colesterol/fosfolipídios varia de aproximadamente 0,2 para espermatozoide suíno a 1,0 para o humano, o que é consistente com os efeitos de condensação e transição de fase do esterol (Parks e Graham, 1992; Parks, 1997).

Comparativamente, a membrana plasmática do espermatozoide suíno apresenta a maior quantidade de proteínas, e o menor teor de colesterol do que outras espécies; apresenta grande quantidade de glicolipídios de alto ponto de fusão; e alta proporção de fosfatidiletanolamina, um fosfolipídio formador de micela invertida. Estas características o tornam mais sensível ao choque frio. Já a membrana do espermatozoide do galo apresenta baixo teor de proteínas, baixa quantidade de fosfatidiletanolamina, teor intermediário de colesterol e a fração de glicolipídios parece não apresentar lipídios de alto ponto de fusão, que estão presentes nos espermatozoide de mamíferos. Assim, essas características moleculares das membranas do espermatozoide do galo podem lhe proporcionar grande resistência às mudanças físicas que ocorrem a baixas temperaturas (Parks e Graham, 1992; Valle e Silva Filho, 2001; citado por Leite, 2008).

Tabela 1- Correlação entre conteúdo de colesterol de membrana de espermatozoides mamíferos e outros parâmetros de membrana e susceptibilidade ao "choque-frio".

Espécie	Micromols de colesterol/10^9 sptz	Micromols de fosfolipídios/10^9 sptz	Proporção molar colesterol: fosfolipídio	Colesterol (mol%) [a]	Proporção de ácidos graxos poli-insaturados: saturados	Espermatozoides intactos após choque-frio (%)
Carneiro	0.722	1.920	0.38	27	2.5	3
Touro	0.893	1.991	0.45	31	3.5	15
Coelho	1.411	1.607	0.88	62	0.8	50
Humano	1.438	1.447	0.99	50	1.0	45

Fonte: Darin-Bennett & White (1977). [a] Porcentagem Molar = $\frac{\text{colesterol}}{\text{colesterol + fosfolipídio}} \times 100$

4.2 Capacitação espermática

Após deixar os testículos os espermatozoides parecem estar maduros do ponto de vista morfológico, porém, ainda não adquiriram a motilidade progressiva nem a habilidade de fertilizar o oócito. Em várias espécies, é durante o trânsito epididimário que a célula espermática adquire a habilidade de se mover progressivamente e o potencial fertilizante, no entanto, ela ainda é incapaz de fertilizar. Uma completa capacidade fertilizante só é obtida pela passagem pelo trato reprodutivo feminino. As mudanças fisiológicas que conferem ao espermatozoide a habilidade de fertilizar são coletivamente chamadas de capacitação (Lamirande et al., 1997; Visconti et al., 1998; Visconti e Kopf, 1998; Zaffalon, 2009).

Segundo Lamirande et al. (1997), a capacitação pode ser definida como uma série controlada de alterações bioquímicas e de membrana, às quais os espermatozoides são submetidos durante a sua migração através do trato genital feminino, com a finalidade de alcançar e se ligarem a zona pelúcida, sofrer a reação acrossômica, e fertilizar o oócito.

A capacitação espermática foi descrita e definida pela primeira vez por Chang (1951) e Austin (1951), trabalhando independentemente, em diferentes espécies. Austin trabalhando com ratos em Sydney, Austrália e Chang em Massachusetts, EUA, utilizando coelhos, descobriram que a maturação final de célula levava por volta de 2-6 horas, sendo que este fenômeno foi prontamente identificado em outras espécies. Porém, passados todos estes anos, este processo fundamental ainda não se encontra completamente elucidado (Lamirande et al, 1997; Andrade, 2009).

Ainda existe controvérsia na definição de capacitação, porque alguns investigadores incluem a reação acrossômica neste processo, enquanto outros não. No entanto, os resultados sobre a reversibilidade, pré-requisitos, e os eventos associados com estes dois processos sustentam o conceito de que eles são diferentes etapas maturacionais. A capacitação é um fenômeno reversível, o que significa que o tratamento de espermatozoides capacitados com substâncias específicas ou fluidos biológicos, tais como o plasma seminal, reduz a sua capacidade para fertilizar oócitos e, portanto, "decapacitando" estas células. Por outro lado, como a reação acrossômica é um processo exocitótico, ela não pode ser interrompida ou revertida, uma vez que é induzida. Além disso, os requisitos iónicos específicos (por exemplo, as concentrações de bicarbonato e cálcio) que promovem a capacitação e reação acrossômica também separam estes dois processos (Yanagimachi, 1994; Lamirande et al., 1997).

Embora a fertilização ainda represente o ponto final de um espermatozoide capacitado, a capacidade do espermatozoide de sofrer uma reação acrossômica (por exemplo, em resposta à zona pelúcida) pode ser tomado como ponto anterior de referência deste evento extratesticular de maturação. Deve ser salientado que capacitação também está correlacionada com as alterações nos padrões de motilidade do espermatozoide em várias espécies, designado como hiperativação espermática (Yanagimachi, 1994; Suarez, 1996). Existem exemplos de casos em que a capacitação e a hiperativação foram dissociados experimentalmente, mas ainda não se pode concluir com certeza que a hiperativação da motilidade representa um evento completamente independente da capacitação. Portanto, para compreender o processo de capacitação a nível molecular, deve-se considerar os eventos que ocorrem tanto na cabeça (a reação acrossômica) como na cauda (isto é, alterações da motilidade) (Visconti et al., 1998; Visconti e Kopf, 1998).

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 (Zaffalon, 2009).

A capacitação é um evento sequencial 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 (Visconti e Kopf, 1998; Flesch e Gadella, 2000; Wertheimer et al., 2008; Andrade, 2009).

A tuba uterina ou o útero representam os sítios fisiológicos de capacitação in vivo em muitas espécies (Yanagimachi, 1994). Entretanto 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. Normalmente, o meio contém uma fonte de energia (ex. piruvato, lactato e glicose), um seqüestrador de colesterol (geralmente a albumina sérica), bicarbonato (HCO_3^-), Ca^{2+}, baixa concentração de K^+ e concentração fisiológica de Na^+, sendo que alguns destes desempenham um importante papel no processo de capacitação. Porém, o mecanismo de ação destes compostos é pouco compreendido do ponto de vista molecular; entretanto muitos eventos moleculares que envolvem o início da capacitação já foram identificados sendo estes: a remoção do colesterol da membrana, o influxo de íons e o aumento da fosforilação do aminoácido tirosina (Visconti e Kopf, 1998; Gadella, 2008; Andrade, 2009).

Os espermatozoides ejaculados são transportados através do útero e preparados para entrar na tuba uterina. Nesta fase, uma grande parte do revestimento extracelular é removida (incluindo os fatores decapacitantes do plasma seminal). O sêmen também encontra um ambiente com alto nível de bicarbonato (Gadella, 2008). Mudanças nos componentes das membranas espermáticas seguem-se progressivamente: perda de proteínas ou redução de seu peso molecular, remoção do glicocálix, redução da proporção de colesterol/fosfolipídio, aumento da mobilidade lateral de lipídios e proteínas (Gadella et al., 2001). As proporções de colesterol:fosfolipídios nas membranas plasmáticas e acrossomal externa diminuem, aumentando sua fluidez. O efluxo de colesterol ocorre em decorrência de sua transferência para albuminas e lipoproteínas de alta densidade (HDL) da tuba uterina. A desestabilização da membrana, provocada pela remoção do colesterol, promove a reorganização dos componentes da bicamada, incluindo redistribuição de proteínas integrais (Gadella et al., 2001).

A albumina sérica, um componente essencial do meio de capacitação *in vitro*, funciona como um carreador do colesterol, se ligando a este e removendo-o da membrana plasmática. Sabe-se que a capacitação pode ser inibida pela adição de colesterol e/ou análogos de colesterol ao meio de capacitação (Cross, 1998). A albumina sérica bovina (BSA) pode ser substituída *in vitro* pela HDL e, demonstrou-se *in vitro* que as BSPs (*bovine seminal plasma proteins*) estão envolvidas no efluxo de colesterol mediado pela HDL no espermatozoide bovino (Thérien et al., 1997) A retirada do colesterol da membrana

plasmática é um processo que antecede múltiplos sinais intrínsecos ao processo de capacitação (Visconti et al., 2002; Andrade, 2009).

O bicarbonato é um potente agente capacitor sendo quase ausente na cauda do epidídimo e no plasma seminal (<1 mM), porém presente na tuba uterina em altas concentrações (>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 espermatozoides de se ligarem às proteínas solubilizadas da zona pelúcida (Visconti e Kopf, 1998; Flesch e Gadella; 2000; Gadella e Van Gestel, 2004).

O bicarbonato é considerado desencadeador da capacitação, estimula uma forma solúvel de adenilato ciclase (AC) espermatozoide específica, resultando no aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que ativa uma proteína quinase A (PKA) que, por sua vez, induz a fosforilação de tirosina de vários substratos (Visconti e Kopf, 1998; Flesch e Gadella, 2000; Gadella e Van Gestel, 2004). Em consequência, as proteínas da membrana plasmática, relacionadas com a ligação na zona pelúcida, se tornam ativadas. Além disso, a fosfolipase C (PLC) do citosol é fosforilada e translocada para a membrana plasmática (Flesch e Gadella, 2000; Gadella et al., 2001). A fosforilação do aminoácido tirosina ativa direta ou indiretamente a troca ("scrambling") dos fosfolipídeos entre os folhetos da bicamada, levando a um aumento da fluidez da membrana plasmática (Harrison et al., 1996; Colenbrander et al., 2002). A troca dos fosfolipídios 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. As trocas entre os fosfolipídios ocorrem somente na região apical da membrana plasmática do espermatozoide sendo este fenômeno um pré-requisito para que ocorra o efluxo do colesterol (Figura 4)

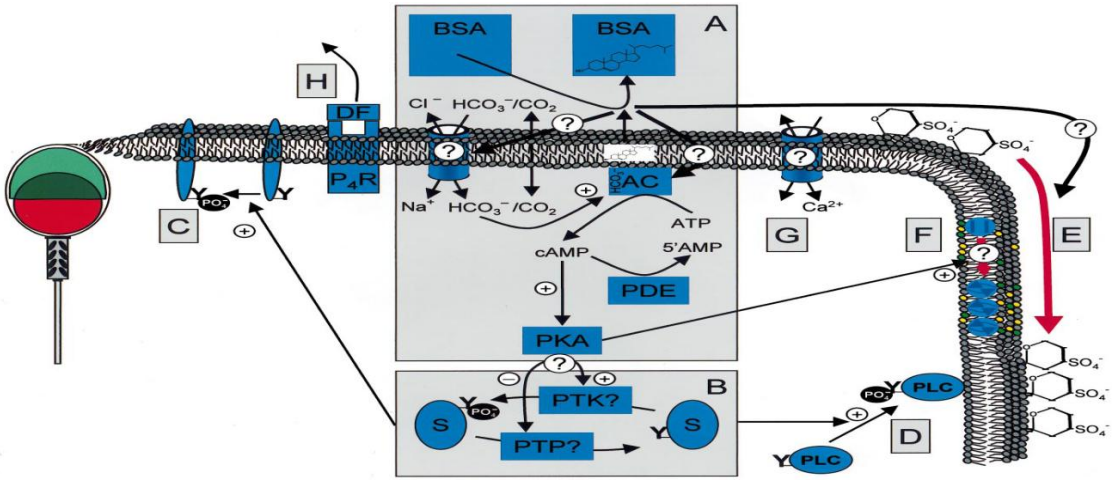


Figura 4 – Sequência da capacitação espermática. **(A)** O bicarbonato pode entrar na célula espermática através dos canais iônicos. O bicarbonato intracelular estimula a AC e a simultânea produção de AMPc ativa a PKA. O efluxo de colesterol pode aumentar a entrada de bicarbonato e afetar a AC. **(B)** A PKA induz a fosforilação da tirosina (Y) em vários substratos (S). **(C)** As proteínas espermáticas de ligação à zona pelúcida (ZP) se tornam fosforiladas. **(D)** PLC do citosol é fosforilada e translocada para a membrana plasmática. **(E)** Ativação da PKA promove redistribuição e translocação de fosfolipídios. **(F)** O efluxo de colesterol está envolvido com as mudanças da membrana. **(G)** A entrada de pequenas quantidades de cálcio nas células espermáticas tem uma função importante na capacitação. **(H)** Fatores decapacitantes (DF) são removidos da superfície da célula espermática, expondo os receptores de progesterona (Adaptado de: Flesch e Gadella, 2000).

(Flesch e Gadella, 2000; Flesch et al., 2001; Zaffalon, 2009).

O envolvimento do Ca^{2+}, no início e/ou regulação da capacitação é controverso até o momento, apesar do uso deste como promotor da reação acrossomal. No espermatozoide de camundongos é evidente a necessidade da presença de Ca^{2+} no meio extracelular para que haja a capacitação, sendo que este atua na via da adenilato ciclase (Visconti et al., 1995), embora estes estudos não tenham mensurado o Ca^{2+} intracelular. 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. No entanto, a ação do Ca^{2+} sobre enzimas envolvidas na transdução de sinal (por exemplo, a adenilato ciclase, fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico) sugere que este cátion divalente provavelmente desempenha um papel importante na capacitação (Lamirande et al., 1997; Visconti e Kopf, 1998).

Os espermatozoides maduros são células inativas quanto à transcrição gênica e inaptas a sintetizar novas proteínas. Portanto, percebe-se a grande importância das fosforilações das proteínas como forma de alterar suas funções, quando comparado a outros tipos celulares. Durante a fertilização, a função espermática é regulada por um sistema de sinais intracelulares que controlam fosforilações de proteínas. A fosforilação dos aminoácidos Serina/Treonina e da Tirosina ocorrem no espermatozoide, mas somente algumas proteínas fosforiladas foram identificadas. Embora a via do AMPc-dependente da proteína quinase A desempenhe um papel central na função espermática e já tenha sido estudada em detalhes (Visconti e Kopf, 1998), o conhecimento sobre as tirosina quinases e outras serina/treonina quinases permanece limitado (Urner e Sakkas, 2003; Andrade, 2009).

Os processos regulados pela fosforilação do aminoácido tirosina incluem a capacitação, hiperativação e a reação acrossomal, todas essas funções necessárias para que o espermatozoide alcance e se fusione ao oócito (Visconti et al., 2002). Portanto, 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 e Kopf, 1998; Andrade, 2009; Zaffalon, 2009).

4.3 Hipermotilidade

O processo de capacitação espermática também envolve mudanças no padrão de motilidade, o qual é denominado de hiperativação (Yanagimachi, 1994). A hiperativação é o processo que o espermatozoide apresenta durante o trajeto pela tuba uterina e é descrito como um movimento espermático vigoroso e não progressivo que está relacionado aos processos de capacitação e fertilização (Verstegen et al., 2002; Zaffalon, 2009).

Durante a hiperativação da motilidade (hipermotilidade) o padrão do movimento, o vigor e a trajetória do espermatozoide passam por grandes mudanças. Ela é caracterizada por movimentos vigorosos e de grande amplitude do flagelo, marcante deslocamento lateral da cabeça e da cauda, baixa frequência de batimento flagelar, associados a uma trajetória não progressiva (Lamirande et al., 1997; Mortimer, 1997; Verstegen et al., 2002; Zaffalon, 2009).

No epidídimo o espermatozoide ainda não possui motilidade. Após a liberação da cauda do epidídimo, no plasma seminal ou em meios fisiológicos, o espermatozoide passa a "nadar". Esse processo é chamado de ativação da motilidade. Quando ativado o espermatozoide apresenta batimentos flagelares simétricos, de baixa amplitude e de grande comprimento de onda, o que resulta num novimento progressivo retilíneo (trajetória linear). Quando o espermatozoide é incubado em condições capacitantes *in vitro*, ou recuperado da tuba uterina após o período de capacitação, ele se torna hiperativado, apresentando um aumento da velocidade, aumento da amplitude do batimento flagelar produzindo um padrão de batimentos altamente assimétrico. Isso faz com que a cabeça assuma uma trajetória helicoidal ou circular. A trajetória helicoidal ocorre quando o batimento flagelar é tridimensional, enquanto que a trajetória circular ocorre quando o batimento flagelar está confinado em um plano (como por exemplo, entre lâmina e lamínula, Figura 5). (Suarez, 1996; Florman e Ducibella, 2006; Suarez, 2008).

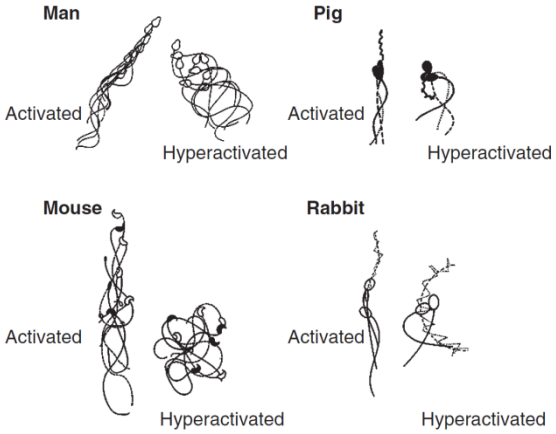


Figura 5- Exemplos de motilidade ativada e hiperativada em várias espécies. (Adaptado de Florman e Ducibella, 2006).

O papel fisiológico da hipermotilidade não está totalmente esclarecido. Várias possíveis funções para a hipermotilidade foram sugeridas. Os espermatozoides hiperativados conseguem penetrar substâncias viscosas e viscoelásticas mais eficientemente do que espermatozoides ativados, o que pode permitir penetrar as secreções mucosas da tuba uterina, na matriz extracelular do cumulus oophorus que envolve o oócito, e a penetração da zona pelúcida. A hiperativação pode auxiliar no deslocamento até o local de fertilização e permite o espermatozoide se destacar da ligação temporária ao epitélio da tuba uterina no reservatório espermático (Istmo). A hiperativação pode atuar também como uma seleção espermática que permite o acesso ao local de fertilização apenas àqueles espermatozoides que tenham completado uma parte do processo de capacitação. (Suarez, 1996; Florman e Ducibella, 2006; Suarez, 2008). Várias dessa dessas funções propostas por Yanagimachi foram confirmadas por diversos experimentos e observações *in vitro* e *in vivo* (Suarez, 2008). Por essas razões imagina-se que a mensuração da hipermotilidade sirva como um marcador biológico para avaliar a capacidade funcional do espermatozoide (Verstegen et al., 2002).

A hiperativação deve ter seu início em lugar e momento apropriado para que o espermatozoide consiga realizar a fertilização (Suarez, 2008; Andrade, 2009). Porém, os mecanismos exatos que levam a ativação da hipermotilidade não são conhecidos. 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. Para Lamirande et al. (1997) o influxo de íons bicarbonato é o que determina o desenvolvimento da motilidade hiperativada. Porém, sabe-se que o Ca^{2+} é o segundo mensageiro primário que desencadeia a hipermotilidade (Suarez, 2008).

A hiperativação tem sido considerada como parte no processo de capacitação; entretanto, há evidências (em bovinos) que a hiperativação é regulada separadamente ou

por uma via de sinalização do Ca^{2+} divergente da que regula a reação acrossomal, tendo em vista que a hiperativação ocorre mesmo quando é adicionado ao meio substâncias que bloqueiam a capacitação, como o H-89, um inibidor da proteína quinase A (PKA), e o Rp-cAMPS, antagonista do cAMP (Marquez e Suarez, 2004). Somando-se a estes achados, Colenbrander et al. (2001) e Andrade (2009) descreveu em equinos que a porcentagem de células hiperativadas de uma determinada população de células com motilidade não teve mudanças quando induzidas à capacitação, concluindo que este movimento característico não pode ser usado na avaliação da capacitação.

O movimento característico apresentado pela célula espermática durante o fenômeno da hiperativação pode ser detectado pelas análises computadorizadas da motilidade (CASA – *Computer Assisted Sperm Analysis*). Este padrão de movimento é representado pelo aumento do ALH (amplitude do deslocamento lateral da cabeça) e do VCL (velocidade curvilinear) e uma redução da LIN (Linearidade) (Verstegen et al, 2002; Andrade, 2009).

4.4 Reação Acrossômica

O oócito de todos os mamíferos eutérios é circundado por um revestimento glicoprotéico, a zona pelúcida, que é circundada pelas células da granulosa oriundas do *cumulus oophorus* recém expandido (Yanagimachi, 1994). Antes de fertilizar o oócito, o espermatozoide deve passar pela zona pelúcida e, para isto acontecer, o espermatozoide tem que sofrer a reação acrossômica assim que se ligar à zona. A reação acrossômica é um evento irreversível de exocitose, caracterizado por um aumento repentino do influxo de Ca^{2+} para o interior da célula e fusão da membrana acrossomal externa com a membrana plasmática (Gadella et al., 2001; Andrade, 2009).

É a ligação inicial entre espermatozoide e zona pelúcida que irá desencadear a reação acrossomal (Gadella, 2008). Entre os componentes da zona pelúcida (ZP), a glicoproteína ZP3 é reconhecida como o indutor natural da reação acrossômica. A ligação à zona pelúcida é um mecanismo mediado por receptores, entretanto, o receptor espermático para a ZP3 ainda não foi (precisamente) identificado na membrana espermática, embora existam vários candidatos (sp56, zonadhesin, p95, e a β-1,4-galactosiltransferase). A cascata de sinalização que culmina com esta reação não é totalmente compreendida, porém, sabe-se que a zona pelúcida e outros agentes como a progesterona acionam a reação acrossômica através da ativação de fluxos iônicos, do metabolismo de fosfolipídeos, dos níveis de cAMP e de fosforilação de proteínas (Darszon et al., 2006; Florman e Ducibella, 2006).

A capacitação acarreta modificações no acrossoma necessárias à reação acrossômica. Portanto, as etapas da capacitação previnem a ativação prematura do acrossoma, até que o espermatozoide atinja o local de fecundação do oócito, na ampola da tuba uterina (Hafez e Hafez, 2004). Células espermáticas com reações acrossomais prematura são consideradas incapazes de fertilizar o oócito (Flesch e Gadella, 2000).

Fatores como o influxo de cálcio, geração de espécies reativas de oxigênio, aumento na atividade da adenilato ciclase e fosforilação de proteínas, que também ocorrem na capacitação, estão envolvidos na indução da reação acrossômica. Portanto, é possível considerar que a capacitação é um evento de "priming" do espermatozoide, durante o qual os sistemas celulares atingem um nível específico de ativação necessário para que aconteça a reação acrossômica, quando exposto ao estímulo adequado (Lamirande et al., 1997; Zaffalon, 2009).

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). Deste modo, libera as enzimas (hialuronidase, proacrosina, esterases, fosfolipase A2, fosfatase ácida, aril-fosfatases, β-N-acetil glucosaminidase, aril amidase e proteínas ácidas não específicas) responsáveis pela lise da zona pelúcida (Hafez e Hafez, 2004; Andrade, 2009).

Flesch e Gadella (2000) propuseram um modelo do mecanismo molecular da reação acrossômica (Figura 6). Com a capacitação ocorre a exposição dos receptores espermáticos da ZP3. As proteínas da zona pelúcida (ZP3) se ligam, promovendo a agregação e a fosforilação da tirosina. O ambiente da zona pelúcida (ZP) contém alta concentração de progesterona, a qual pode se ligar a um receptor na superfície espermática. Ambos, ZP e a progesterona têm efeito sobre a superfície espermática. O pH intracelular aumenta por meio da proteína G e o potencial de membrana despolariza. Esse aumento do pH, juntamente com a despolarização da membrana, promovem entrada de cálcio (através da ativação de canais de Ca^{2+} voltagem dependente). O aumento do Ca^{2+} intracelular ativa a fosfolipase C (PLC) que foi translocada para a membrana plasmática durante a capacitação. A PLC converte o Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) em diacilglicerol (DAG) e Inositol-trifosfato (IP_3). O aumento do Ca^{2+} ativa a fosfolipase A2 (PLA2), que degrada a fosfatidilcolina (PC) em lisofosfatidilcolina (LPC) e ácidos graxos livres (FFA). O papel do IP_3 não é conhecido, porém, DAG, FFA e LPC ativam uma proteína quinase C (PKC). O aumento do Ca^{2+} e a ativação da PKC são necessários para a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa, o que promove a subsequente secreção de enzimas

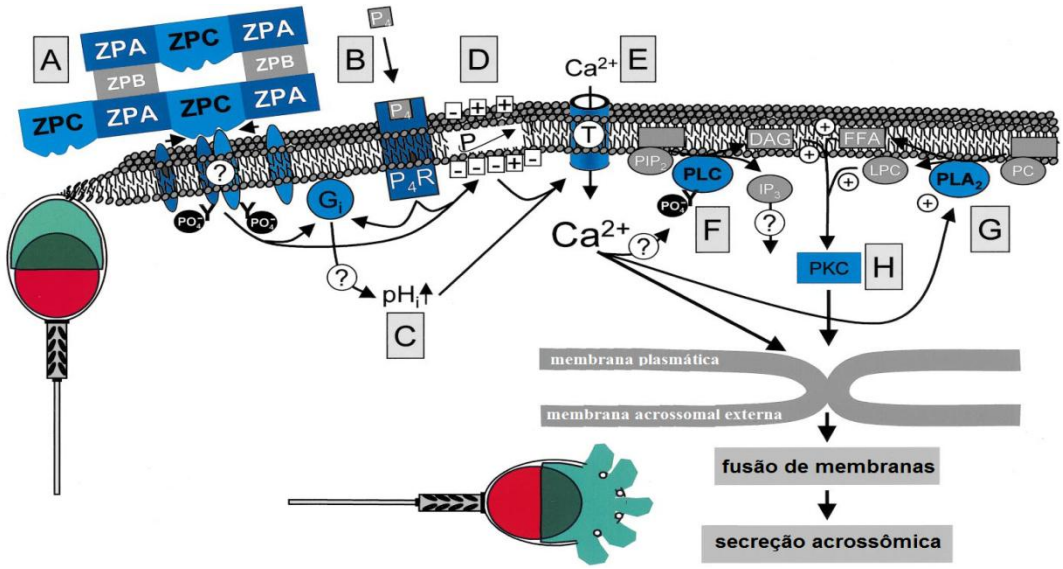


Figura 6- Sequência da reação acrossômica. **(A)** as proteínas da zona pelúcida (ZP) se ligam aos receptores espermáticos, promovendo a agregação e a fosforilação da tirosina (Y). **(B)** O ambiente das ZP contém alta concentração de progesterona, que pode se ligar a um receptor na superfície espermática. Ambos, ZP e a progesterona têm efeito sobre a superfície espermática. **(C)** pH intracelular aumenta por meio da proteína G e **(D)** o potencial de membrana despolariza. (**E**) O aumento do pH e a despolarização da membrana, promovem entrada de cálcio (através de canais de Ca^{2+} voltagem dependente) (**F**). O aumento do Ca^{2+} intracelular ativa a PLC que converte o PIP_2 em DAG e IP_3 (**G**) O aumento do Ca^{2+} ativa a PLA2, que degrada PC em LPC e ácidos graxos livres (FFA). (**H**) O papel do IP_3 não é conhecido, porém, DAG, FFA e LPC ativam uma proteína quinase C (PKC). Essas mudanças são necessárias para a fusão das membranas e secreção de enzimas acrossômicas (Adaptado de: Flesh e Gadella, 2000).

acrossômicas (Flesh e Gadella, 2000).

A reação acrossomal permite ao espermatozoide hiperativo penetrar através da zona pelúcida. Uma vez que um espermatozoide atinge o espaço perivitelino, seu destino é se ligar e fundir com o oolema. Em contraste com o evento de ligação à zona pelúcida, este evento é menos espécie-específico (Gadella, 2008).

4.5 Peroxidação lipídica

O espermatozoide, como qualquer outra célula em condições aeróbias, produz espécies reativas de oxigênio (EROs ou *ROS – Reactive Oxygen Species*), também conhecidos como radicais livres, sendo a maior parte delas originadas do metabolismo normal da célula. Dentre as EROs formadas, podemos citar o ânion superóxido ($O2^{-\bullet}$), 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; Lamirande et al., 1997; Lamirande e O'Flaherty, 2008). O desemparelhamento de elétrons, situação energeticamente instável, é o que confere alta reatividade a estas moléculas (Sharma e Agarwal, 1996).

As EROs são produzidas por uma variedade de sistemas e reações, tais como sistemas de transporte de elétrons (mitocondrial e microsomal), xantina oxidase, e peroxidases (Lamirande e O'Flaherty, 2008). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2), através da citocromo oxidase mitocondrial, sofre redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O) (Bergendi et al., 1999). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido a reativos intermediários como o radical superóxido ($O2^{-\bullet}$) e hidroxil ($OH^{\bullet}$), e também a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Cohen, 1989; citado por Bustamante Filho, 2006). Além desta fonte, no espermatozoide se destacam as NAD(P)H oxidases e a oxido nítrico sintetase (NOS), que produzem níveis baixos e controlados de EROs no momento de ativação de processos fisiológicos (Lamirande e O'Flaherty, 2008)

Atualmente existe um crescente interesse na avaliação de EROs produzidas pelos componentes celulares do sêmen, pois foi demonstrado que os espermatozoides de mamíferos são susceptíveis a danos causados por uma produção elevada destes radicais, interferindo nas funções e na integridade de suas estruturas (Guerra et al., 2004; Zaffalon, 2009).

O plasma seminal possui enzimas e algumas moléculas com ação antioxidante, tais como a glutationa peroxidase, superóxido desmutase, catalase, vitamina E, vitamina C, uratos, albumina, taurina, hipotaurina, entre outras. Esses agentes controlam a produção de pró-oxidantes, como as EROs, prevenindo possíveis danos celulares. Porém, na presença de um grande número de células inflamatórias e espermatozoides defeituosos, ou em procedimentos que diminuam acentuadamente a quantidade de plasma seminal, há um aumento na produção de EROs (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 EROs estão envolvidas com a hiperativação dos espermatozoides, sendo sua produção um pré-requisito para capacitação espermática, além de estar relacionada à ligação com a zona pelúcida e fusão do espermatozoide com o oócito (Brouwers e Gadella, 2003; Raphael, 2007).

No processo de capacitação espermática, uma baixa produção de espécies reativas de oxigênio é necessária para que ocorra a geração do cAMP, que irá levar a um aumento da fosforilação do aminoácido

tirosina através da estimulação da proteína quinase A. Caso as espécies reativas de oxigênio sejam eliminadas (pelo uso de antioxidantes ou inibidores), a produção de cAMP é inibida e o evento da capacitação é suspenso (Aitken et al., 1995; Aitken et al., 2004; Lamirande e O'Flaherty, 2008).

Porém, a produção excessiva de EROs 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 et al., 2004; Raphael, 2007). Acredita-se que os principais alvos de ataque de EROs são os lipídeos encontrados nas membranas plasmática e acrossomal (Zaffalon, 2009).

Estudos em espermatozoides humanos (Wang et al., 1997) e bovinos (Chatterjee e Gagnon, 2002) demonstraram que o resfriamento e os ciclos de congelamento e descongelamento levam a um aumento da produção de EROs pelos espermatozoides. Chatterjee e Gagnon, (2002) observaram que durante a criopreservação do sêmen bovino, os processos de resfriamento e descongelamento levam a um aumento da produção de radicais superóxidos ($O2^{-\bullet}$). Embora a produção de óxido nítrico permaneça inalterada durante o resfriamento de 22 a 4ºC, durante o descongelamento foi observado um aumento súbito do óxido nítrico. Como também ocorre produção de EROs durante o processo de capacitação, esta produção de EROs é um indicativo de que ocorre um processo de criocapacitação.

A manipulação dos espermatozoides também pode causar um aumento na peroxidação lipídica. Isto leva a danos irreversíveis ao espermatozoides (danos à membrana, especialmente para o acrossoma), e também inibe a motilidade espermática. O resfriamento, preservação na forma líquida por longo prazo, a sexagem e a congelação do sêmen são exemplos de manipulação que podem causar aumento da peroxidação lipídica (Klinc e Rath, 2007). Entretanto, os espermatozoides podem ser protegidos contra a peroxidação lipídica através do uso de anti-oxidantes. A catalase e o piruvato de sódio têm sido utilizados com êxito para a proteção do espermatozoide bovino (Bilodeau et al., 2002; Klinc e Rath, 2007).

O processo de peroxidação lipídica inicia-se na presença de EROs, que ao ter contato com os ácidos docosaexaenoicos da membrana espermática, retiram um hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, que por sua vez irá agir em outro ácido docosaexaenoico. 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 espermatozoide (Marques et al., 2002; Raphael, 2007).

A peroxidação lipídica pode ser quantificada e localizada após a coloração espermática com a sonda C11-BODIPY$^{581/591}$. Esta sonda é um análogo dos ácidos graxos poli-insaturados sendo prontamente incorporada à membrana celular. A sua reatividade à peroxidação é comparável a dos ácidos graxos poli-insaturados. Quando intacta esta sonda emite fluorescência vermelha, com comprimento de onda de 580 a 620 nm. Porém, quando sofre peroxidação pelas EROs, torna-se verde, cujo comprimento de onda é 495 a 545 nm. A alteração da emissão de fluorescência para verde indica a presença de espécies reativas de oxigênio na parte hidrofóbica da bicamada lipídica das membranas espermáticas. Devido a estas características, esta sonda é uma maneira prática para detectar peroxidação lipídica,

podendo ser utilizada na citometria de fluxo ou em outros aparelhos com leitores a laser (Brouwers e Gadella, 2003; Silva e Gadella, 2006). Estudos com espermatozoides bovinos, suínos e equinos, utilizando esta sonda, demonstraram que a peroxidação lipídica ocorre principalmente na peça intermediária, em menor proporção na parte posterior da cauda e praticamente ausente na cabeça do espermatozoide (Brouwers e Gadella, 2003; Raphael, 2007).

4.6 Criopreservação do sêmen

A disponibilidade de gametas viáveis e funcionalmente normais é um pré-requisito para uma fertilização bem-sucedida em mamíferos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* e, por isso, é um ponto crítico para a implementação de uma grande variedade de tecnologias reprodutivas, tais como a inseminação artificial, fertilização *in vitro*, transferência de embriões e engenharia genética. Devido a isto, a criopreservação de gametas e embriões se tornou um procedimento complementar essencial para a aplicação destas tecnologias, pois eliminam as limitações de tempo e localização (Parks, 1997).

Desde a descoberta do glicerol como agente crioprotetor efetivo para o espermatozoide do galo por Polge et al. (1949), o sêmen de uma grande variedade de espécies, incluindo o da espécie humana, vem sendo congelado e usado com sucesso para a inseminação artificial (Parks e Graham, 1992). Medido em termos do número de espécies, que tiveram seus espermatozoides criopreservados com sucesso e do grande número de animais nascidos resultantes da IA com espermatozoides criopreservados, o processo de criopreservação parece eminentemente bem-sucedido (Leibo e Bradley, 1999).

Entretanto, isto está parcialmente correto. Em média, cerca de 50% dos espermatozoides humanos e bovinos, são danificados ou destruídos pelo congelamento, limitando a total eficiência e eficácia da preservação de sêmen. Com outras espécies, os resultados podem ser até mesmo piores e mais variáveis (Leibo e Bradley, 1999; Watson, 2000). Além disso, como demonstrado por Critser et al. (1987), mesmo aquelas células que sobreviveram ao congelamento, e que são móveis, com membranas intactas, não mantêm sua viabilidade e capacidade de fertilização por tanto tempo quanto espermatozoides não-congelados (Leibo e Bradley, 1999).

Apesar deste relativo sucesso da criopreservação do sêmen, com exceção dos bovinos, o sêmen criopreservado não é amplamente utilizado para a inseminação artificial de animais domésticos, em parte porque os protocolos de criopreservação não proporcionam um nível aceitável de fertilidade. A reduzida fertilidade do sêmen congelado é amplamente atribuída a alterações da estrutura e função das membranas durante o resfriamento, congelamento e descongelamento (Parks e Graham, 1992; Watson, 2000).

A sobrevivência do espermatozoide no processo de criopreservação requer uma solução simultânea de uma equação multifatorial. Dentre os fatores que influenciam neste processo incluem-se a manutenção da integridade estrutural e funcional de cada compartimento celular, incluindo a membrana plasmática do espermatozoide, o acrossoma, as mitocôndrias, o citoesqueleto, o núcleo e o glicocálix (Hammerstedt et al., 1990; Graham, 1996a; Melo, 1999).

A criopreservação causa danos a todos os compartimentos do espermatozoide. Estes danos são responsáveis pela perda de motilidade, viabilidade, integridade acrossomal e, finalmente, a perda da capacidade fecundante do sêmen criopreservado (Holt, 2000b). No entanto, o sêmen criopreservado pode ser utilizado

efetivamente para a inseminação artificial (IA) em várias espécies, quando as técnicas de IA são modificadas. Em geral, aumentando o número de espermatozoides por dose, depositando a dose inseminante mais profundamente no trato reprodutivo feminino (útero ou tuba uterina) e reduzindo o intervalo de tempo entre a inseminação e a ovulação, as taxas de prenhez com sêmen criopreservado podem ser melhoradas (Watson, 2000). Apesar de melhorar a fertilidade, estas estratégias requerem mudanças nos esquemas de manejo utilizados nas fazendas para muitas espécies, e estes custos de manejo aumentados, combinados com baixa fertilidade, inibem o uso extensivo do sêmen criopreservado para muitas propriedades (Mocé et al., 2010a).

Um dos objetivos da indústria de sêmen criopreservado é reduzir o número de espermatozoides em cada dose inseminante, para que mais doses possam ser produzidas a partir de cada ejaculado (Vishwanath e Shannon, 2000), mas isso só pode ser alcançado melhorando a taxa de sobrevivência celular na criopreservação. O objetivo final das centrais de IA é a obtenção de taxas de fertilidade com sêmen criopreservado similares ao sêmen fresco, utilizando uma dose inseminante baixa e técnicas tradicionais de IA. Apenas quando esse objetivo for alcançado, o sêmen criopreservado será atraente tanto para os produtores quanto para as centrais (Mocé et al., 2010a). Portanto, novas estratégias de criopreservação são necessárias para aumentar o número de espermatozoides vivos e a qualidade destes pós-descongelamento.

4.7 Etapas da criopreservação convencional de sêmen (protocolos)

O desenvolvimento de um sistema completamente novo de armazenamento de sêmen (na forma congelada) somente foi possível após a fortuita descoberta do glicerol como um agente crioprotetor eficaz por Polge et al.(1949). Este desenvolvimento empírico de um método de criopreservação estável a longo prazo à temperaturas muito baixas (-196 ºC), iniciou uma nova era de aplicações práticas da criobiologia, especialmente para o melhoramento genético animal. Depois disso, o método de *congelamento lento* dominou o campo da criopreservação, e ainda continua a ser a base da maioria das técnicas criobiológicas em utilização nas instalações de produção e nos laboratórios de pesquisa (Vishwanath e Shannon, 2000; Katkov et al, 2006).

O sêmen congelado em palhetas 0,5 mL ou de 0,25 mL tornou-se a unidade universalmente aceita de armazenamento e transferência de genética bovina para os pecuaristas (Baracaldo et al., 2007). A técnica de congelamento de sêmen em palhetas em nitrogênio líquido é agora universal. Esta tecnologia está bem estabelecida e todos os equipamentos necessários para o envase do sêmen em palhetas, raqueamento e congelamento estão prontamente disponíveis comercialmente (Vishwanath e Shannon, 2000). Neste tópico serão revisadas as principais etapas dos protocolos de criopreservação convencional.

O sêmen bovino pode ser coletado por meio de vagina artificial ou por eletroejaculação. O método de coleta por vagina artificial é utilizado quase exclusivamente em centrais de IA por razões práticas (necessidade de treinamento dos touros) e porque produz amostras de sêmen fisiológicas (alta concentração). Após a coleta, o sêmen é analisado quanto aos aspectos físicos (volume, aspecto, turbilhão, concentração espermática, motilidade e vigor) e morfológicos (defeitos maiores e menores) (Baracaldo et al., 2007). Os métodos de processamento do sêmen imediatamente após a coleta variam consideravelmente. Estes geralmente são guiados por métodos de manipulação que atendem as necessidades das centrais de IA, os requerimentos para o controle de doenças, e

os protocolos para exportação de sêmen (Vishwanath e Shannon, 2000).

Existem basicamente dois principais protocolos de diluição e criopreservação: o método *two-step* (padrão) e o método *one-step* (alternativo). A diferença básica entre estes dois protocolos é o método de adição do glicerol. O glicerol pode ser adicionado ao sêmen em uma fração separada do diluidor (duas etapas de diluição), ou por uma única adição do diluente já contendo o glicerol (uma etapa) (Salamon e Maxwell, 1995a; Baracaldo et al., 2007). Nos Estados Unidos o método mais utilizado é *o two-step*, enquanto na Europa os protocolos *one-step* são mais comuns (Baracaldo et al., 2007).

Os diluidores mais utilizados para protocolo *two-step* possuem Tris ou citrato de sódio como tampão, gema de ovo para proteger as células do *cold-shock*, e consistem em duas frações (A e B) e mais um coquetel de antibióticos. A fração B possue a mesma composição básica da A, porém contém 14% de glicerol. No método *one-step* geralmente se utilizam apenas diluidores a base de Tris e 20% de gema. O diluidor *one-step* não é fracionado e contém 7% de glicerol, além de antibióticos (Baracaldo et al., 2007).

Na técnica de diluição, logo após a coleta é adicionado um coquetel de antibióticos ao sêmen *in natura*. O sêmen é então diluído lentamente com um pequeno volume da fração A aquecida (ou diluidor fração única, no método *one-step*) em um tubo de 50 mL. Esta primeira diluição é feita na proporção de 1:1 até 1:5 semen/diluidor, e é realizada a 28-32°C em um banho-maria (Vishwanath e Shannon, 2000; Baracaldo et al., 2007). Esta diluição inicial é necessária para fornecer um meio tamponante, a proteção do antibiótico, e para proporcionar um isolamento térmico durante o resfriamento (Vishwanath e Shannon, 2000).

Após essa diluição inicial, dependendo do número calculado de palhetas a ser processado, o ejaculado será novamente diluído com a fração A até atingir 50% do volume final. (no método *one-step*, nesta etapa é realizada a diluição final do sêmen). A temperatura do diluidor deve ser sempre a mesma do sêmen a ser diluído. O sêmen diluído deve então ser resfriado lentamente até 5°C durante um período mínimo de 2h, inicialmente colocando-o à temperatura ambiente, e posteriormente em uma câmara fria ou em um refrigerador a 5ºC. Após atingir 5ºC deve-se adicionar a outra metade do volume de diluidor, que corresponde à fração B (com glicerol), a qual deve estar pré-resfriada a 5°C. A fração B deve ser adicionada gradualmente ao sêmen diluído ao longo de um período de 30 min até que a proporção de 1:1 seja atingida. O volume final de sêmen diluído terá uma concentração de 7% de glicerol (esta etapa não existe no método *one-step*, uma vez que o diluidor total já contém glicerol). O sêmen deve permanecer em equilíbrio (tempo de equilíbrio) a 5°C por pelo menos 4h. É normalmente durante este período que se realiza o preenchimento e a vedação das palhetas, além da colocação destas em racks para contagem e congelamento (Vishwanath e Shannon, 2000; Baracaldo et al., 2007).

A concentração final de espermatozoides/ mL de sêmen diluído difere entre as centrais, porém normalmente a concentração média está entre 10 a 20 milhões de espermatozoides por dose inseminante (Vishwanath e Shannon, 2000).

No processo de criopreservação do sêmen bovino, a adição do glicerol bem como o envase do sêmen e a vedação das palhetas é geralmente realizado a 5ºC, entretanto, é preferível realizar estes procedimentos à temperatura ambiente. Em bovinos, pesquisas anteriores (Kupferschmied, 1976; Wass et al., 1980) não encontraram diferenças significativas nas taxas de não-retorno quando o sêmen foi processado à

temperatura ambiente (20-22°C) ou em câmara fria (4-5°C) quando se utilizou diluidores à base de Tris. Devido a isto vários países europeus passaram a realizar estes procedimentos à temperatura ambiente (citado por Januskauskas et al., 1999).

Após resfriamento (até 5°C) e o envase, as palhetas com o sêmen diluído podem ser congeladas utilizando o método convencional (vapor estático de nitrogênio) ou utilizando máquinas de congelamento automatizado. No método convencional pelo vapor estático de nitrogênio, as palhetas são colocadas em suportes (racks) e suspensas horizontalmente a 4 cm (3-5 cm) acima da superfície do nitrogênio líquido por 10-15 min. Após a congelação as palhetas são mergulhadas diretamente no nitrogênio liquido. Nos sistemas de congelamento automatizados, um computador controla a temperatura dentro da câmara onde se encontram as palhetas e reduz a temperatura de 5°C até a menor temperatura escolhida (ex. -140°C) à uma taxa de congelamento escolhida (ex. 10°C/min). O monitor do computador mostra as curvas de temperatura para a câmara de congelamento e para as palhetas que estão sendo congeladas. Nos modelos de injeção de vapor de nitrogênio, a temperatura é controlada pelo computador através do controle do fluxo de nitrogênio para a câmara de congelamento. A vantagem desse sistema é que um pequeno número ou um grande número de palhetas podem ser congelados com segurança e precisão (Baracaldo et al., 2007).

Muitas centrais de IA ainda continuam utilizando o sistema convencional onde as palhetas são submetidas a condições de congelamento não controladas, e que dependem da distância das palhetas em relação à superfície do nitrogênio líquido. Nesses sistemas, a taxa de congelamento está entre 150-300°C/min. A vantagem desse sistema é que, dentro de um ciclo de congelamento, todas as palhetas são submetidas às mesmas taxas de congelamento, porque as palhetas são colocadas em apenas uma camada acima do nível do N_2 líquido (Vishwanath e Shannon, 2000). Na figura 7, está representada a curva de temperatura durante a criopreservação com as suas diferentes etapas (resfriamento, tempo de equilíbrio, e congelamento).

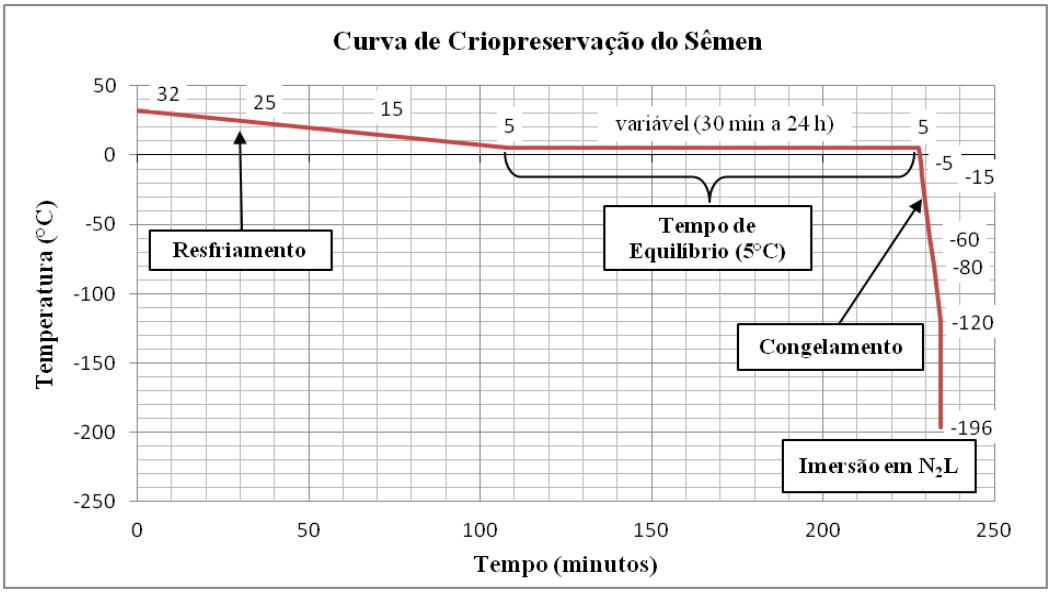


Figura 7 - Curva de temperatura no processo de criopreservação do sêmen. Estão representadas as variações de temperatura durante as diferentes etapas do processo de criopreservação.

4.8 Princípios da criopreservação do espermatozoide bovino

A criopreservação do sêmen busca a suspensão do metabolismo espermático e a manutenção de suas características por um período de tempo prolongado. O sucesso da criopreservação do sêmen depende da manutenção do potencial fertilizante dos espermatozoides, que devem apresentar integridade e funcionalidade de diferentes estruturas celulares (Amann e Pickett, 1987; Hammerstedt et al., 1990; Celeghini, 2005).

Segundo Amann e Pickett (1987), para que o espermatozoide seja capaz de fertilizar o oócito, ele precisa reter pelo menos quatro atributos básicos após o congelamento e descongelamento:

a) Metabolismo para a produção de energia;
b) Motilidade progressiva;
c) Enzimas acrossomais, que são essenciais para a penetração do espermatozoide através das estruturas que circundam o oócito;
d) Proteínas da membrana plasmática, que são importantes para a sobrevivência do espermatozoide dentro do trato reprodutivo feminino e para a ligação do mesmo com a membrana do oócito durante a fertilização.

O processo de criopreservação do sêmen é dividido em passos distintos: diluição, resfriamento, congelamento, armazenamento, e descongelamento. Cada um desses passos tem sua relação com a estrutura funcional das membranas e metabolismo celular (Hammerstedt et al., 1990; Celeghini, 2005). A preservação das estruturas espermáticas após o congelamento é obtida por uma interação entre diluidor, crioprotetor, curvas de resfriamento e congelamento, e descongelamento, buscando minimizar os danos causados pelo choque frio, formação de cristais de gelo e desidratação celular (Amann e Pickett, 1987; Celeghini, 2005).

Durante os processos de congelamento e descongelamento, os espermatozoides estão sujeitos a uma variedade de estresses. Dentre esses se incluem a adição de crioprotetores antes do congelamento, mudanças de volume, distensão e encolhimento da membrana em conseqüência da exposição a condições hiperosmóticas causadas pelos crioprotetores e pela desidratação induzida pelo congelamento, a mudança de fase termotrópica e liotrópica dos fosfolipídios de membrana, os efeitos da elevada concentração de solutos e a formação de cristais intracelulares que são dependentes da taxa de resfriamento (Parks e Graham, 1992; Holt, 2000b).

4.8.1 Efeitos da variação de temperatura

A célula espermática não está adaptada para passar pelas variações de temperatura envolvidas no processo de criopreservação (Holt, 2000b). Alterações na motilidade e na estrutura dos espermatozoides ocorrem simultaneamente nas diferentes etapas de congelamento e descongelamento. Quando o resfriamento do sêmen dos ungulados é realizado muito rapidamente entre 30ºC e 0ºC induz a um estresse letal para algumas células que é proporcional à taxa de resfriamento, intervalo de temperatura e ao limite de temperatura, sendo geralmente mais severo na faixa de 2 a 12ºC. Este fenômeno é conhecido como choque frio (cold shock), o qual afeta variavelmente as espécies (Watson, 1995; Watson, 2000; Gonzalez, 2004).

O choque frio é evidenciado pela presença de muitos espermatozoides em movimento circular ou apresentando motilidade espermática alterada (movimento retrogrado, presença de peças intermediárias dobradas), perda prematura da motilidade, diminuição da produção de energia, aumento da permeabilidade da membrana e perda de moléculas e íons intracelulares. Essas alterações são devidas a danos nas

membranas espermáticas, as quais são bioquimicamente diferentes, mas apresentam estruturas semelhantes (Amann e Pickett, 1987; Gonzalez, 2004; Celeghini, 2005).

Mesmo no resfriamento lento a mudança da temperatura determina estresse sobre a membrana, sendo provável que este processo seja devido à mudança de fase dos lipídios da bicamada e alteração do estado funcional da membrana. O choque frio pode ser visto então como um estado extremo de um "*continuum*" (uma seqüência) de estresses, influenciado pela taxa de início do fenômeno. Esses estresses sobre a membrana podem ocorrer abaixo de 0ºC, uma vez que as mudanças de fase não estão completas a 0ºC, porém estudos preliminares foram incapazes de demonstrar tais injúrias abaixo de 0ºC no espermatozoide bovino. Sabe-se que no sêmen bovino a maior mudança de fase ocorre entre 5 e 15ºC, intervalo de temperatura no qual o espermatozoide está mais susceptível a injúrias (Watson, 1995; Watson, 2000; Gonzalez, 2004).

A sugestão de que as lesões da membrana resultam de eventos de mudança de fase na bicamada lipídica é bem comprovada. Estudos das membranas utilizando a técnica de "*freeze fracture*" antes, durante, e após o resfriamento mostraram clara evidência de eventos de separação de fase, os quais são apenas parcialmente revertidos após o reaquecimento (Holt e North, 1984; De Leeuw et al., 1990; citados por Watson, 2000).

A temperatura é um fator importante na alteração da fluidez da membrana. A fluidez da membrana é devida à capacidade das moléculas de fosfolipídios de se movimentarem lateralmente. As mudanças inerentes ao resfriamento de qualquer célula são exarcebadas pelo choque frio. Pode-se presumir que com uma redução rápida da temperatura, a reorganização das membranas é mais difícil e mais áreas podem apresentar a fase hexagonal II, com um aumento da permeabilidade da membrana. De qualquer forma, a manutenção do metabolismo e do gradiente iônico está prejudicada (Amann e Pickett, 1987).

A sensibilidade ao choque frio varia de acordo com o grau de maturação do espermatozoide, espécie, variação individual e quantidade de plasma seminal, e pode ser determinada pelo conteúdo de colesterol da membrana e o grau de saturação dos ácidos graxos, os quais influenciam na fluidez da membrana plasmática (Watson, 1981b; Cottorello, 2002).

Parks e Lynch (1992) detectaram em seu estudo que o tipo de fosfolipídio predominante na membrana também influenciava na sensibilidade ao choque frio, e espécies com maior proporção de fosfatidilcolina/ fosfatidiletanolamina eram mais resistentes. Esses autores também observaram que quanto maior o conteúdo de proteína da membrana, mais baixa a resistência ao choque frio.

4.8.2 Efeitos da Osmolaridade

Quando células são congeladas e descongeladas, elas sofrem vários ciclos de desidratação e reidratação osmóticas, resultando em mudanças de volume extremas. A primeira ocorre quando as células são colocadas dentro de um aditivo crioprotetor, como o glicerol, e novamente quando a solução congela, e depois no descongelamento, e finalmente quando o agente crioprotetor é removido da célula. Essas mudanças de volume dos espermatozoides resultam do efluxo de água quando uma célula é exposta inicialmente a uma solução hipertônica, e da reentrada da água quando essa célula, que foi exposta a um agente crioprotetor (ACP), é recolocada em uma solução isotônica (Leibo e Bradley, 1999).

A adição e remoção do crioprotetor causam um considerável, porém transiente, estresse osmótico à membrana plasmática do espermatozoide, dependendo da permeabilidade relativa do crioprotetor (Gao et al., 1993). Geralmente, o crioprotetor de escolha para o espermatozoide é o glicerol (ou ocasionalmente o dimetilsulfóxido), que induz estresse osmótico. Gao et al. (1995), demonstraram que quando espermatozoides humanos foram exposto à concentração de 1 M de glicerol em uma única etapa, a mudança de volume excedia os limites toleráveis tanto para a adição quanto para a remoção. Eles demonstraram que o estresse pode ser reduzido a limites toleráveis pela realização da adição e remoção do crioprotetor em etapas, e isso melhorou substancialmente a proporção de espermatozoides vivos (Watson, 2000).

4.8.3 Efeitos da formação de cristais de gelo

O estresse induzido pela formação de cristais de gelo está associado principalmente com as mudanças na pressão osmótica da porção não congelada que a acompanha (Watson e Duncan, 1988; Watson, 2000).

Quando uma suspensão de espermatozoides é resfriada abaixo de 0ºC, começam a se formar cristais de gelo extracelulares. A membrana plasmática atua como uma barreira impedindo o crescimento dos cristais dentro da célula. Os sais são excluídos dos cristais de gelo e isto causa um aumento na concentração de sais no fluido extracelular não congelado, o que aumenta a pressão osmótica extracelular. Inicialmente a água do meio intracelular não sofre congelamento, mas é resfriada abaixo do ponto de congelamento. Ocorre então uma passagem da água do meio intracelular para o extracelular e, assim, os espermatozoides sofrem uma desidratação progressiva. Se não ocorrer essa desidratação da célula, ocorre formação de cristais de gelo intracelulares. Se a taxa de congelamento é muito lenta, a alta concentração de sais intracelulares, devido à desidratação excessiva da célula, pode lesar o espermatozoide. Se a taxa de congelamento é muito rápida, pode ocorrer a formação de cristais de gelo intracelulares. A taxa de congelamento ótima é uma conciliação entre esses dois fatores (Amann e Pickett, 1987; Parks e Graham, 1992; Watson, 2000).

A duração da exposição a tais condições deve ser minimizada para uma taxa de sobrevivência ótima; isto implica que a taxa de congelamento deve ser relativamente rápida. Entretanto, a taxa de congelamento deve ser lenta o suficiente para permitir a perda de água da célula por osmose, evitando a formação intracelular de cristais de gelo, que é letal à célula. Devido a isso, os espermatozoides são congelados em taxas rápidas na faixa entre 15 a 60ºC/min, que foram determinadas empiricamente apresentando as melhores taxas de sobrevivência (Watson, 2000; Gonzalez, 2004).

Os danos primários à membrana ocorrem durante o congelamento e descongelamento na faixa de temperatura entre – 15 a – 60ºC, e não durante a estocagem das células em nitrogênio líqüido a –196ºC (Parks e Graham, 1992). Os espermatozoides resfriados abaixo da zona intermediária crítica, entre – 15ºC e – 60ºC, suportam a temperatura do nitrogênio líquido sem maiores problemas. Nessa temperatura, os espermatozoides são menos sensíveis aos danos causados pelas altas concentrações de soluto, podendo ser estocados por tempo indeterminado (Amann e Pickett, 1987; Graham, 1996 b, citado por Snoeck, 2003).

Essas condições resultam em danos celulares por várias razões. Primeiramente, quando mais de 90% da água osmoticamente ativa é retirada, a membrana plasmática pode sofrer separações laterais de fases ou transições de

fase liotrópicas de fase lamelar para a hexagonal. Essas mudanças ultra-estruturais são resultados da desidratação osmótica, e não pela formação de gelo intracelular, e resultam em permeabilidade não-seletiva da membrana (Parks e Graham, 1992).

A formação de cristais de gelo intracelular ocorre com taxas rápidas de congelamento, e isso pode induzir lesões celulares e morte celular. O mecanismo pelo qual os cristais de gelo intracelulares exercem seu efeito não é completamente entendido. Grandes cristais de gelo intracelulares são deletérios para as células enquanto os microcristais intracelulares não o são necessariamente (Parks e Graham, 1992).

4.8.4 Efeitos das taxas de resfriamento

Embora as etapas no processamento de sêmen antes do equilíbrio sejam fáceis de controlar, o resfriamento das palhetas que se segue, em suportes até 4 ou 5ºC deve ser realizado sob ótimas condições já que a maioria dos espermatozoides de mamíferos é sensível a um resfriamento rápido (Januskauskas et al., 1999).

A taxa de resfriamento e o tempo de equilíbrio têm sido testados no espermatozoide bovino tentando determinar empiricamente a curva ideal de resfriamento (Gonzalez, 2004). Pesquisas realizadas por Dhami et al. (1992,1993), avaliaram o efeito do congelamento com diferentes taxas de resfriamento, períodos de equilíbrio e efeito de diluidores sobre parâmetros de motilidade e sobrevivência espermática.

Dhami et al. (1992) realizaram o congelamento do sêmen de touros Holstein-Friesian e de búfalos Murrah, com o diluidor Tris (contendo ácido cítrico, frutose, gema de ovo e glicerol), utilizando apenas 1 h de tempo de equilíbrio, e várias taxas de resfriamento (15, 30, 60 e 120 min. de resfriamento de 10º a 5ºC vs. uma amostra controle por 120 min. de 28º até 5ºC) e diferentes temperaturas e taxas de descongelamento: 40ºC/60seg; 60ºC/15seg; e 80ºC/5seg. As amostras de sêmen foram avaliadas quanto à motilidade pré-congelamento e pós-descongelamento e quanto à porcentagem de sobrevivência após 1 h de incubação a 38ºC. Os resultados encontrados indicavam que uma taxa de resfriamento lenta de 2 horas iniciando a 10ºC ou a 28ºC é essencial para a criopreservação do sêmen bovino. Entretanto, o sêmen de búfalo pode ser congelado com sucesso após 30 minutos de resfriamento iniciando a 10ºC. Além disso, observou-se que a temperatura de descongelamento de 60ºC proporcionou motilidade pós-descongelamento mais alta que a 40ºC. Neste experimento observou-se que uma taxa de resfriamento rápida foi prejudicial para a motilidade e sobrevivência dos espermatozoides bovinos. Posteriormente, Dhami e Sahni (1993) encontraram que o resfriamento lento foi favorável, considerando a baixa perda de enzimas (transaminase – GOT) como uma medida indireta da integridade da membrana plasmática.

Porém, Januskauskas et al. (1999) comparam o efeito de duas taxas de resfriamento (0,1ºC/min vs. 4,2ºC/min), partindo da temperatura ambiente (19 a 21ºC) até 4ºC, sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento *in vitro* e fertilidade após a inseminação artificial. Os pesquisadores não observaram diferenças estatísticas para a motilidade pós-congelamento avaliada subjetivamente por microscopia óptica; a integridade da membrana plasmática (avaliada pelos corantes fluorescentes Calcein AM/EthD-1; SYBR-14/PI); a integridade acrossomal (avaliada pelo FITC-PSA); e o status de capacitação (método de coloração por clortetraciclina CTC) avaliados por microscopia de epifluorescência. Também não se observou diferença (P>0,05) para fertilidade avaliada pela taxa de não-retorno

aos 56 dias. No entanto, a porcentagem de espermatozoides móveis e os parâmetros de cinética dos espermatozoides − velocidade do trajeto (VAP); velocidade progressiva (VSL); e velocidade curvilinear (VCL) − avaliados por sistema computadorizado (CASA), diferiram significativamente entre os tratamentos. O tratamento com resfriamento lento apresentou menor porcentagem de espermatozoides móveis e os espermatozoides tornaram-se mais ágeis independente do parâmetro avaliado, e apresentaram um grande aumento na velocidade curvilinear (VCL). Especulou-se que isto poderia afetar negativamente a longevidade do espermatozoide devido a sua relação com a hiperativação. Os resultados indicaram que a maioria dos parâmetros de viabilidade pós-descongelamento e os resultados de fertilidade não diferiram significativamente entre as duas taxas de resfriamento e que o resfriamento lento não é mais benéfico que o resfriamento rápido.

Segundo Januskauskas et al. (1999), a diferença das respostas desse estudo e dos trabalhos Dhami et al. (1992,1993) pode ter sido devido às diferenças nas taxas de resfriamento assim como nos métodos utilizados para avaliar as lesões dos espermatozoides pós-descongelamento. Além disso, os trabalhos de Dhami et al. (1992, 1993) não utilizaram curvas de resfriamento precisamente controlada, e sim curvas empíricas colocando as palhetas em recipientes com água refrigerada enquanto que Januskauskas et al. (1999) realizaram curvas bem controladas utilizando maquinas de congelamento automatizadas.

4.8.5 O tempo de equilíbrio

Um fator importante no processo de criopreservação é o tempo de equilíbrio. Os protocolos de congelamento de sêmen bovino geralmente incluem resfriamento lento até 4-5ºC, seguido por um intervalo variável de equilíbrio (de 30 min a 24 h) a esta baixa temperatura antes do congelamento. Normalmente, o glicerol é adicionado durante esse intervalo, especialmente quando se utiliza o diluidor citrato-gema. Por isso, este período é às vezes erroneamente referido como "tempo de equilíbrio do glicerol". Embora no passado se acreditasse que esse intervalo era importante para o equilíbrio do glicerol, o glicerol penetra o espermatozoide bovino rapidamente e pode ser adicionado a qualquer momento durante o período de resfriamento (Berndtson e Foote, 1969; Vishwanath e Shannon, 2000; Muiño et al., 2007; Leite et al., 2010). Entretanto, ainda existem dúvidas sobre a real função do tempo de equilíbrio no processo de criopreservação (Gao et al., 1997).

Até recentemente, na literatura não existia um consenso quanto à necessidade e duração do equilíbrio na criopreservação de sêmen bovino e seus efeitos sobre a viabilidade espermática (Gao et al., 1997; Leite et al., 2010). Além disso, existe o desejo de se reduzir ou eliminar essa etapa, acelerando assim o processo de criopreservação, contanto que isto não comprometa a qualidade pós-descongelamento dos espermatozoides (Dhami et al, 1992;. Dhami e Sahni, 1993; Leite et al, 2010). Além disso, existem problemas de definição do que é o tempo de equilíbrio, visto que alguns autores consideram que os processos de resfriamento e o tempo de equilíbrio não são necessariamente etapas independentes do processo de criopreservação (Salamon e Maxwell, 1995a).

Na maioria dos estudos que abordam esta questão, a motilidade pós-descongelamento (avaliada subjetivamente) é o único método de avaliação da sobrevivência espermática (Berndtson e Foote, 1969; Pickett e Berndtson, 1978). Entretanto, a análise visual por microscopia não é um método preciso, e não é capaz de prever a fertilidade com precisão (Arruda et al., 2007; Leite et al., 2010). Até recentemente, ainda existiam dúvidas a respeito do efeito do tempo de

equilíbrio sobre a motilidade espermática, integridade das membranas, e sobre função mitocondrial (Leite et al., 2010).

Vários estudos (Dhami et al., 1992; Dhami and Sahni, 1993; Foote and Kaproth, 2002; Muiño et al., 2007; Leite et al., 2010) ainda questionavam a necessidade de realizar o tempo de equilíbrio e seu benefício real para viabilidade espermática. Além disso, a duração mínima do equilíbrio necessário para se ter bons resultados na criopreservação do sêmen permanecia controversa (Dhami et al., 1992; Dhami e Sahni, 1993; Leite et al., 2010).

No início do desenvolvimento da tecnologia de criopreservação do sêmen bovino, muitos aspectos do protocolo de criopreservação, incluindo a concentração de glicerol, a taxa e temperatura de adição do glicerol, e a duração de equilíbrio foram cuidadosamente avaliados. Em uma extensa revisão de literatura, Pickett e Berndtson (1978) concluíram com base em resultados de vários testes de fertilidade a campo, que o resfriamento lento e um período de equilíbrio a 5ºC eram necessários para obter a fertilidade máxima. Com base nesses resultados, um tempo de equilíbrio de 4-18 h antes do congelamento foi recomendado. Experimentos com diferentes tempos de equilíbrio a 5ºC, na presença ou ausência do glicerol, foram realizados visando determinar o tempo ótimo necessário para equilibrar o glicerol em ambos os lados da membrana plasmática do espermatozoide. Esses experimentos produziram evidências de que o glicerol é capaz de penetrar rapidamente (2-5 min) o espermatozoide bovino (Berndtson e Foote, 1969, 1972a, b), sugerindo que o tempo de equilíbrio é importante para as membranas espermáticas se adaptarem a baixas temperaturas, e não para a penetração e equilíbrio de glicerol.

Vários pesquisadores utilizaram avaliações subjetivas do sêmen na tentativa de estabelecer a duração ótima do tempo de equilíbrio. Entretanto, existem relatos conflitantes em relação à sobrevivência e fertilidade do sêmen bovino criopreservado (Foote e Kaproth, 2002), especialmente quando se trabalhou com diferentes diluidores, métodos de envase, e taxas de resfriamento e congelamento diferentes (Graham et al., 1957; Leite et al., 2010).

Por exemplo, Miller e Vandermark (1954) compararam 2, 6 e 18 h de equilíbrio utilizando o citrato-gema (EYC) e encontraram que 6h foi suficiente para se obter uma sobrevivência espermática aceitável. Entretanto, O'Dell e Hurst (1956) utilizando EYC e leite desnatado, relataram uma maior recuperação espermática para 0 h em comparação com 18 h. Ennen et al. (1976), utilizando palhetas, avaliando a motilidade após um período de incubação (38ºC/2h) pós-descongelamento, não encontraram diferenças entre 1, 2 e 4 h de equilíbrio, mas estes tempos apresentaram melhores resultados do que 16 h. Estes pesquisadores observaram que o tempo de equilíbrio ótimo para criopreservação em palhetas estava entre 2 e 10 h de equilíbrio e era dependente da taxa de resfriamento, e que o sêmen resfriado lentamente parece necessitar de menor tempo de equilíbrio para obter uma motilidade ótima. Utilizando os diluidores Tris-gema e leite integral-gema-glicerol, Dhami et al. (1992) e Dhami e Sahni (1993) relataram que o resfriamento lento e pelo menos 2 h de equilíbrio a 5°C melhoraram a motilidade pós-descongelamento (44 vs. 35,5%) e a fertilidade (57,9 vs. 47.2%, taxa de não-retorno aos 90 dias) em comparação com o tratamento sem tempo de equilíbrio. Além disso, os autores especularam que melhores resultados poderiam ser obtidos se maiores tempos de equilíbrio fossem utilizados.

Recentemente, Leite et al. (2010) apresentaram novas provas que demonstram a importância da utilização do tempo de equilíbrio. Leite et al. (2010) estudaram o efeito dos três menores tempos de equilíbrio

(0, 2 e 4 h) e de dois diluidores diferentes, TRIS (a base de gema) e Bioxcell® (lecitina de soja) na criopreservação do sêmen bovino. Observou-se que os tratamentos controle (0 h) apresentaram os menores valores de motilidade e de integridade das membranas, não havendo diferença entre os diluidores para estes tratamentos. O diluidor TRIS apresentou melhor ação crioprotetora do que o Bioxcell® com os maiores valores de motilidade total e progressiva e de integridade de ambas as membranas (plasmática e acrossomal) para 2 e 4 h, e a menor proporção de membrana plasmática lesada (72,2% vs. 85,8%) em todos os tempos. O tempo de equilíbrio de 4 h produziu os resultados mais desejáveis de motilidade e integridade das membranas e o menor percentual de membrana plasmática lesada (86,5; 78,0 e 72,6% para 0, 2 e 4 h, respectivamente).

No geral, Leite et al. (2010) observaram que a combinação de TRIS e 4 h de equilíbrio foi o melhor protocolo de criopreservação do sêmen, apresentando os maiores valores de motilidade total e progressiva e de integridade de ambas as membranas (TRIS-T4 = 26,8%; BIO-T4 = 18,3%). Concluiu-se que o tempo de equilíbrio é necessário para a preservação da motilidade e integridade das membranas plasmática e acrossomal. Além disso, as interações entre o tempo de equilíbrio e o tipo de diluidor durante o processo de criopreservação levam a maior sobrevivência espermática. Por isso, estes pesquisadores propuseram que o tempo de equilíbrio facilita a adaptação das membranas e do metabolismo celular à baixas temperaturas e que estes mecanismos de ação parecem estar inter-relacionados com os mecanismos de proteção da LDL da gema propostos por Bergeron et al. (2004), permitindo que os espermatozoides tornem-se menos suscetíveis aos danos causados pela criopreservação.

Um importante aspecto deste estudo de Leite et al. (2010) foi a utilização de máquinas de congelamento automatizado, o que proporcionou curvas de resfriamento e congelamento altamente controladas. Além disso, a utilização de sistema automatizado de avaliação da motilidade (CASA) e da citometria de fluxo para avaliação da motilidade e integridade das membranas, facilitando a comparação entre os menores tempos de equilíbrio com maior precisão que os estudos anteriores. A utilização destes métodos e equipamentos permitiu minimizar ou eliminar a subjetividade das análises e os fatores de confundimento que provavelmente contribuíram para as incertezas geradas nos estudos anteriores, em relação aos efeitos do tempo de equilíbrio sobre a sobrevivência espermática no processo de criopreservação.

4.8.6 Efeitos das taxas de congelamento

A maioria das teorias sobre crioinjúria relaciona-se às conseqüências da formação e dissolução de cristais de gelo, que variam de acordo com as taxas de congelamento. O processo de desidratação que acompanha o congelamento lento está potencialmente associado com a sobrevivência celular, enquanto que no congelamento a taxas rápidas a probabilidade de morte celular é maior. Para o espermatozoide a taxa ótima de resfriamento entre −5ºC e −45ºC está entre 10ºC/min e 80ºC/min (Watson, 1995).

Os protocolos de criopreservação de sêmen normalmente têm utilizado taxas de congelamento que variam desde 10 a 100ºC/min, obtendo-se boas taxas de sobrevivência pós-criopreservação (Agca e Critser, 2002, citado por Gonzalez, 2004).

O resfriamento dos espermatozoides abaixo de 0ºC (congelamento), em uma taxa lenta promove maior egresso da água da célula do que quando o resfriamento é realizado numa taxa rápida. Dessa forma um resfriamento muito lento pode levar a uma desidratação celular muito intensa, enquanto, um

resfriamento muito rápido é insuficiente para permitir o egresso da água, o que acarreta a formação de cristais de gelo intracelular. A taxa de resfriamento ideal deve ser relativamente rápida, resultando em suficiente e não excessiva retirada de água intracelular, o que pode levar a formação de cristais de gelo intracelulares pequenos e não letais, proporcionando boas condições de sobrevivência da célula após o reaquecimento (Amann e Pickett, 1987; Celeghini, 2005).

Quando o sêmen diluído é resfriado abaixo da temperatura de 5ºC, inicialmente o meio diluidor ao redor do espermatozoide, e as próprias células, encontram-se não congeladas, porque os pontos de congelamento dos diluidores (devido aos crioprotetores) e do líqüido intracelular estão abaixo de 0ºC. Ocorre então um fenômeno chamado de super-resfriamento. Entre as temperaturas de −5ºC e −15ºC, dependendo da curva de congelamento e do diluidor, começam a se formar cristais de gelo no diluidor, enquanto os espermatozoides permanecem super-resfriados. Ocorre então o aumento da concentração de solutos ao redor do espermatozoide e do gradiente osmótico culminando com a desidratação da célula (Amann e Pickett, 1987; Snoeck, 2003).

Em pesquisa realizada por Chen et al. (1993), foi testado o efeito do super-resfriamento (−13 ou −14ºC antes do congelamento até −196ºC) e da indução da formação de cristais de gelo ("seeding") no sêmen de touros sobre a motilidade pós-descongelamento de sêmen em diluidores a base de Tris-gema e leite integral. Este experimento demonstrou que os espermatozoides são mais sensíveis a mudanças de temperatura quando congelados com leite integral do que em Tris-gema, na faixa entre −50 a −75ºC (temperatura de transferência para o nitrogênio). Esse estudo revelou que os espermatozoides passam por uma fase de super-resfriamento semelhante ao que ocorre aos embriões durante o congelamento. Os efeitos sobre a motilidade foram menores quando o sêmen diluído foi submetido ao "seeding", mas esses efeitos foram avaliados apenas imediatamente após o descongelamento. As taxas de congelamento de −15, −25 e −35ºC/min foram semelhantes em relação à sobrevivência espermática e foram superiores ao congelamento a −5ºC/min.

Em geral é aceito que a resposta ao congelamento é influenciada principalmente pela permeabilidade da célula à água e aos solutos. Devido a isso, para entender a criobiologia do sêmen, nas décadas anteriores um considerável esforço foi realizado na tentativa de determinar as características de permeabilidade dos espermatozoides de várias espécies (Leibo e Bradley, 1999).

Leibo e Bradley (1999) e Agca e Critser (2002) relataram que as pesquisas têm sido direcionadas no sentido de otimizar os protocolos de criopreservação quantificando alguns parâmetros biofísicos, como o coeficiente de permeabilidade da membrana celular para a água (Lp), para o crioprotetor (Pcpa) assim como a sua energia de ativação (Ea). Estes parâmetros têm sido determinados em espermatozoides de várias espécies de mamíferos e utilizados na tentativa de predizer o tipo e a concentração ótima do crioprotetor, a velocidade de adição e de retirada do crioprotetor, além da taxa de congelamento e descongelamento. Porém, os resultados obtidos têm deixado dúvidas a respeito da importância da velocidade de passagem da água pela membrana na determinação da taxa de resfriamento ideal, já que as técnicas utilizadas superestimam os valores (Leibo e Bradley, 1999; Gonzalez, 2004).

Entretanto, outros trabalhos como os realizados por Devireddy et al. (1999, citado por Leibo e Bradley, 1999), e por Chaveiro

et al. (2006), utilizando técnicas diferentes de mensuração dos valores de Lp e de Ps (coeficiente de permeabilidade para o glicerol), obtiveram valores próximos aos valores obtidos empiricamente.

No trabalho realizado por Chaveiro et al. (2006), concluiu-se que existem diferenças significativas entre touros na Lp e Ps da membrana plasmática do espermatozoide. Isto indica que machos diferentes podem requerer ajustes nos protocolos de congelamento. A aplicação desses dados em um modelo teórico para simular os eventos osmóticos durante o congelamento resultou na predição de taxas de congelamento (taxa de 25–44ºC/min entre – 4 e – 50ºC) que se situam na mesma faixa dos valores obtidos empiricamente (taxa de 30–65ºC/min).

4.8.7 Efeitos do descongelamento

O sucesso final de um procedimento de congelamento também é limitado pelo processo de descongelamento do sêmen. E em termos gerais, se a taxa de resfriamento (no processo de congelamento) é rápida, a taxa de reaquecimento (processo de descongelamento) também deve ser rápida. Se a taxa de resfriamento é lenta, a taxa de reaquecimento deve ser lenta (Amann e Pickett, 1987; Celeghini, 2005). Quando a taxa de resfriamento é mais lenta ou mais rápida que a ideal, os danos celulares podem ser abrandados por taxas de reaquecimento apropriadas (Celeghini, 2005).

Um aspecto das diferentes teorias da crioinjúria é a questão se a lesão ocorre durante o congelamento ou no descongelamento. Existem algumas evidências que sugerem que as células criopreservadas podem ser lesadas pelo descongelamento, o que se acredita ser devido à recristalização (Watson, 1995).

A recristalização é um fenômeno que ocorre durante o descongelamento, devido à reorganização de microcristais de gelo intracelulares em cristais maiores que são considerados lesivos à célula espermática. Evidências que suportam este mecanismo foram observadas devido à redução da sobrevivência de células causada pelo descongelamento lento de células que sofreram congelamento rápido. O descongelamento rápido dessas células que foram congeladas rapidamente permite o descongelamento desses cristais antes que ocorra a recristalização, enquanto que o reaquecimento lento permite reorganização dos cristais, resultando em lesão e morte celular (Mazur, 1984; Watson, 1995; Leibo e Bradley, 1999; Celeghini, 2005).

Um possível problema do descongelamento lento é a mudança osmótica devido à entrada de água na célula, que é considerada mais lesiva do que a saída durante o congelamento (Curry e Watson, 1994). Holt et al. (1992) avaliaram a permeabilidade da membrana como resultado do congelamento e descongelamento e observaram que os efeitos só podiam ser observados durante o reaquecimento na faixa de 2 a 30ºC (ou seja, bem depois do descongelamento dos cristais e da rediluição do soluto que se concentrou durante o congelamento). Isto sugere, novamente, que as lesões na membrana se manifestam durante a fase de descongelamento, mas que outros eventos, além da simples diluição dos solutos, podem ser importantes. Esses autores sugeriram que mudanças de fase dos lipídios podem estar envolvidas nessas alterações (Watson, 1995).

O descongelamento envolve um processo inverso, forçando a célula a retroceder seu curso pela passagem de várias mudanças de fase, e tem com o resultado o fluxo de água para dentro da célula. A taxa de mudança de temperatura deve permitir o movimento de água e de crioprotetor sem a formação de cristais de gelo intracelular ou mudanças irreversíveis na membrana (Amann e Pickett, 1987; Watson, 1995; Holt, 2000b; Gonzalez, 2004).

Embora os efeitos prejudiciais do resfriamento rápido sejam reconhecidos há muitos anos, o aquecimento rápido tem sido reconhecido até recentemente como benigno. Porém já foi descrita a ocorrência de lesão do acrossoma resultante do reaquecimento rápido nos espermatozoides bovinos (Senger et al., 1976). Bamba e Cran (1985, 1988) relataram que o reaquecimento rápido do espermatozoide suíno de 5ºC a 37ºC foi extremamente prejudicial às estruturas do acrossoma. Efeitos semelhantes foram observados para o espermatozoide de coelho, mas no espermatozoide bovino os danos representaram um aumento do defeito "*Knobbed*" do acrossoma. Esses estudos podem indicar que deve-se ter cuidado quando se realiza o descongelamento rápido do sêmen criopreservado (Watson, 1995).

4.9 Vitrificação e as novas teorias da criopreservação

Quando as células são mantidas em um meio líquido, estas são submetidas a processos de degradação, que levam à perda da viabilidade celular. Para evitar essa degradação, as células precisam ser colocadas em condições que, essencialmente, parem todas as reações químicas durante o tempo de armazenamento. Como a formação de gelo intracelular é letal para a maioria das células eucarióticas, o armazenamento estável de células viáveis pode ser obtido apenas se ocorrer vitrificação intracelular sem a formação de gelo (Katkov et al., 2006).

Tradicionalmente, na comunidade científica, a congelação lenta convencional (*equilibrium freezing*) não é associada com a vitrificação, e esta é muitas vezes referida como um método alternativo. No entanto, na verdade, durante a formação dos cristais, a maior parte da água é congelada fora do meio (externamente) e da célula na forma de gelo, e a parte líquida remanescente torna-se cada vez mais concentrada, formando verdadeiros "canais ou veias" de meio concentrado onde as células se encontram presas (**Figura 8**). As células não podem sobreviver com grandes cristais de gelo intracelulares, assim a formação de gelo intracelular na maioria dos casos mata as células (Mazur, 1984; Leibo e Bradley, 1999; Katkov et al., 2006).

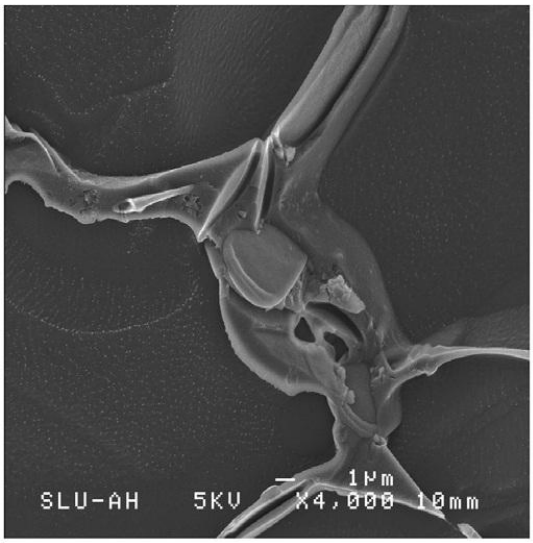


Figura 8 - *Cryo-scanning electron microscopy* (Cryo-SEM) micrografia de um espermatozoide suíno aprisionado nos canais (matriz) do diluidor concentrado e envolvido por "lagos de gelo" (4000 x) (Adaptado de: Hernández et al., 2007).

No entanto, se o congelamento é realizado de forma lenta o suficiente (a velocidade crítica depende da relação superfície/volume e permeabilidade da membrana à água em função da temperatura), as células passam a perder água praticamente em equilíbrio com o compartimento extracelular. Portanto, as células viáveis serão aquelas que estão localizadas em um espaço (canais) solidificado entre os cristais de gelo, e os seus compartimentos intracelulares também estão livres de cristais de gelo. Este estado sólido que assegura a sobrevivência da célula a uma temperatura extremamente baixa pode ser apenas o estado *vítreo*. Não existe líquido, gel ou outro estado da matéria em uma suspensão de células a -196 °C, mas

apenas gelo ou "vidro". O *estado vítreo* é o único lugar onde as células sobrevivem e podem ser mantidas essencialmente para sempre, uma vez que a temperatura de transição vítrea da água plastificante mais potente é mais elevada (-137 °C) do que a temperatura de armazenamento (-196 °C), e isto garante a manutenção do estado vítreo com a sua enorme viscosidade ($10^{13,5}$ Pa s) e essencialmente paraliza todas as reações químicas, e assim, o envelhecimento e a degradação celular (Katkov et al., 2006).

Os danos celulares que os espermatozoides sofrem quando são submetidos à altas taxas de congelamento geralmente tem sido atribuídos à formação de gelo intracelular, embora nenhuma evidência convincente de formação de gelo intracelular nos espermatozoides tenha sido obtida (Morris et al., 2012). Recentemente, Morris et al. (2012) trabalhando com o estudo da ultraestrutura de soluções e da matriz que envolve os espermatozoides na criopreservação, apresentaram evidências de que à altas taxas de arrefecimento as lesões celulares nos espermatozoides são resultado de um desequilíbrio osmótico que ocorre durante o descongelamento, e não devido a formação de cristais de gelo intracelulares. Isso acontece por que:

- O alto teor de proteína intracelular, juntamente com o encolhimento osmótico associado com a formação de gelo extracelular, leva à vitrificação intracelular do espermatozoide.

- Um desequilíbrio osmótico ocorre quando se utilizam taxas de congelamento rápido, devido a uma *cristalização do gelo limitada pela difusão* no fluido extracelular, ou seja, a redução do tempo disponível para a cristalização, leva a redução do tempo disponível para a água migrar dos "canais" de solução concentrada para o gelo extracelular, isto faz com que a água fique aprisionada dentro dessa matrix concentrada (canais) e então forma pequenos cristais de gelo extracelulares. Os espermatozoides que foram congelados nessas altas taxas são submetidos a um choque osmótico à baixas temperaturas quando são descongelados, causando a lesão celular observada.

Segundo Morris et al. (2012) esta explicação permite melhor compreensão sobre aspectos da criobiologia de espermatozoides e pode levar no futuro ao desenvolvimento de melhores métodos de criopreservação de espermatozoides de mamíferos.

Recentemente foi criado outro método de vitrificação de espermatozoides, chamado "CPAs-free vitrification", ou seja, "vitrificação na ausência de crioprotetores". Esse método se baseia em mergulhar rapidamente uma suspensão de células em um agente de refrigeração, como o nitrogênio líquido. A utilização de taxas extremamente altas de congelamento (10^5-10^6 °C/min), e um descongelamento praticamente instantâneo impede formação de cristais de gelo em pequenas amostras, e não requer a utilização de altas concentrações de agentes crioprotetores (CPAs). Excelentes resultados foram obtidos com espermatozoides humanos (Isachenko et al., 2005; Katkov et al., 2006).

4.10 Composição dos meios diluidores

Os componentes básicos dos diluidores para criopreservação são essencialmente os mesmos usados para estocagem à temperatura ambiente. Segundo Vishwanath e Shannon (2000) os requerimentos gerais são:

- Substâncias iônicas e não iônicas para manter a osmolaridade do meio e para o tamponamento do meio;
- Uma fonte de lipoproteínas ou material de alto peso molecular que evita o

choque frio, como a gema de ovo ou leite;
- Glicerol, propanodiol, ou dimetilsulfoxido (DMSO) para crioproteção;
- Glicose ou frutose como fontes de energia;
- Outros aditivos tais como enzimas e antibióticos.

O plasma seminal, sozinho, não é capaz de proteger adequadamente os espermatozoides contra mudanças de temperatura. Para o sêmen ser estocado em baixa temperatura é necessário que os espermatozoides sejam diluídos em diluidores especiais e apropriados (Salamon e Maxwell, 1995a, citados por Snoeck, 2003).

Phillips (1939) realizou uma importante descoberta quando observou que a adição da gema de ovo ao diluidor do sêmen teve um efeito benéfico sobre a fertilidade do sêmen resfriado. E posteriormente, Phillips e Lardy (1940) recomendaram o uso de um diluente contendo partes iguais de tampão fosfato e gema de ovo como agente protetor contra o choque-frio (cold shock). Desde então, a gema de ovo em combinação com Tris e citrato tem sido o componente mais comum na maioria dos diluentes para congelamento de sêmen bovino (Vishwanath e Shannon, 2000). Inicialmente utilizava-se o fosfato como tampão desses diluidores. Posteriormente, descobriu-se que o citrato apresentava adequada capacidade tamponante além de aumentar o período de sobrevivência dos espermatozoides armazenados a 5ºC (Willett e Salisbury, 1942). O citrato se tornou então o sal de escolha, e suas propriedades quelantes melhoraram a solubilidade da fração protéica da gema de ovo. A razão da substituição do fosfato pelo citrato deve-se ao fato de que o fosfato inibe a oxidação do ácido lático causando a sua acumulação (White, 1956, citado por Vishwanath e Shannon, 2000).

Na década de 1970, vários estudos se concentraram no uso de tampões orgânicos (Tris, TES, MES, HEPES, PIPES, MOPS e BES) baseado no fato que eles possuem melhor capacidade tamponante do que o fosfato ou o citrato, e são relativamente não-tóxicos para as células. Além disso, podem penetrar no espermatozoide, desse modo atuando como tampões intracelulares contra mudanças de pH, ou podem aumentar a tolerância da célula ao aumento intracelular de cátions monovalentes. Os tampões aumentam a tonicidade total do diluidor, o que é importante quando o sêmen é armazenado (Salamon e Maxwell, 2000; Vishwanath e Shannon, 2000).

Muitos dos tampões orgânicos zwitteriônicos (compostos químicos eletricamente neutros, mas que apresentam cargas positivas e negativas formais em átomos diferentes) provaram apresentar boa capacidade tamponante sobre uma ampla faixa de pH, e foram testados na preparação de diluidores. Entretanto, os diluidores a base de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) tornaram-se universais, e este meio tamponante combinado com gema de ovo e glicerol foram testados extensivamente para sêmen bovino (Vishwanath e Shannon, 2000). Por alguma razão, ainda não completamente entendida, quando se utiliza o Tris como tampão existe a vantagem de não ser necessário esperar até o final do resfriamento para se adicionar o glicerol (Ball e Peters, 2004).

4.10.1 Agentes crioprotetores

A criopreservação das células, mantendo sua viabilidade, é um processo muito complexo. Durante o congelamento e descongelamento as células podem ser danificadas facilmente (Dumoulin et al., 1994). Para as células sobreviverem ao processo de criopreservação é necessária a presença de agentes crioprotetores durante o resfriamento, congelamento e descongelamento. Os agentes crioprotetores

são definidos como a classe de componentes que atuam especificamente na manutenção da viabilidade das células animais nos processos de congelamento e descongelamento (Gilmore et al., 1997, citado por Snoeck, 2003).

Os crioprotetores podem ser classificados conforme o seu modo de ação em penetrantes e não penetrantes. Os crioprotetores penetrantes são moléculas pequenas como o glicerol, etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, que atravessam a membrana e atuam nos meios intra e extracelulares (Sztein, 2001; Celeghini 2005).

Os crioprotetores não penetrantes não conseguem atravessar a membrana plasmática, pois são moléculas grandes, como proteínas (da gema de ovo, e do leite desnatado), açúcares (frutose, glicose, manose, rafinose e trealose), polímeros sintéticos (polivinilpirrolidona e metilcelulose) e amidas, que atuam no meio extracelular, ou seja, atuam como solutos ou colóides (De Leeuw et al., 1993; Gao et al., 1997; Cottorello e Henry, 2002; Celeghini, 2005). Os agentes crioprotetores não penetrantes aumentam a osmolaridade do meio extracelular, induzindo a saída de água das células levando a desidratação, reduzindo assim a possibilidade de formação de cristais de gelo intracelulares durante o congelamento (Amann e Pickett, 1987).

A maioria dos crioprotetores intracelulares serve de solvente e soluto, enquanto os extracelulares, incluindo proteínas, lipídios e açúcares são solutos ou colóides e não servem como solvente (McKinnon, 1996, citado por Snoeck, 2003).

Os crioprotetores intracelulares têm ação tanto por meio de propriedades coligativas ou por meio de sua ligação com a água. Uma das propriedades coligativas dos crioagentes é sua capacidade de reduzir o ponto de congelamento das soluções. A água pura congela à temperatura de 0ºC, enquanto uma solução contendo crioprotetores congela em temperatura mais baixa (Mazur, 1980, citado por Snoeck, 2003).

Os crioprotetores intracelulares possuem uma estrutura bioquímica que promove a ocorrência de pontes de hidrogênio com moléculas de água. As pontes de hidrogênio modificam a orientação das moléculas de água nos cristais de gelo, proporcionando um ambiente menos nocivo para as células (Dalimata e Graham, 1997).

4.10.2 Crioprotetores intracelulares (Penetrantes)

Os agentes crioprotetores penetrantes (ACP) são substâncias que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que o congelamento causa sobre a célula (Karow, 2001, citado por Gonzalez, 2004; Leite, 2008). As características físico-químicas ideais que um agente crioprotetor penetrante deve possuir são: baixo peso molecular; alta solubilidade em meio aquoso e principalmente uma baixa toxicidade celular (Nash, 1966, citado por Gonzalez, 2004).

Muitas substâncias são classificadas como agentes crioprotetores intracelulares e têm sido utilizadas nos diluidores de congelamento de várias espécies. Existem os crioprotetores do grupo dos álcoois: etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol, polietilenoglicol e propilenoglicol. As amidas, incluindo a acetamida, formamida, lactamida e dimetil-sulfóxido, além de outras substâncias que podem possuir efeito crioprotetor (Snoeck, 2003).

O glicerol ou Propano-1,2,3-triol (IUPAC, 1993) é um composto orgânico pertencente a função álcool que apresenta três grupos hidroxilas. Esta substância é considerada um ACP, pois consegue penetrar no citoplasma da célula (Holt, 2000b; Gonzalez, 2004) O glicerol foi o primeiro crioprotetor a ser

utilizado em espermatozoides (Polge et al., 1949) e tem sido amplamente utilizado para o sêmen bovino (Gonzalez, 2004).

A ação protetora do glicerol parece estar ligada as suas propriedades coligativas que permitem realizar pontes de hidrogênio com a água; a redução do ponto de congelamento e a conseqüente redução da concentração de eletrólitos (sais ou solutos) na fração não congelada ajudariam a conter o prejudicial "efeito solução" que ocorre durante o processo de congelamento (Holt, 2000b). As pontes de hidrogênio realizadas com a água diminuem a formação de cristais de gelo e reduz o aumento de tamanho desses cristais além de diminuir a concentração de solutos nos meios extra e intracelulares (Dalimata e Graham, 1997). Essas ligações de hidrogênio também promovem uma estabilização da estrutura quaternária das proteínas de membrana preservando-as da desidratação (Karow, 2001, citado por Gonzalez, 2004).

Segundo Kundu et al. (2000), outro mecanismo de proteção desta molécula se deve à capacidade de ligação dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila (OH) com os átomos de oxigênio dos grupos fosfato dos fosfolipídios da membrana do espermatozoide, promovendo assim a estabilização da membrana durante o processo de criopreservação.

A concentração de glicerol utilizada como crioprotetor é limitada pela sua toxicidade, a qual depende da taxa de resfriamento, velocidade de congelação, composição do meio diluidor e método de adição do glicerol (Fahy, 1986; citado por Gonzalez, 2004). Métodos convencionais de congelação em palhetas de 0,25 mL e 0,5 mL têm utilizado quantidades de 7% de glicerol como concentração ótima para diluidores à base de citrato-gema ou Tris-gema (De Leew et al., 1993). As concentrações de glicerol para congelação do sêmen bovino têm estado entre 0,25 M (2,25%) e 1M (9%), sendo que esta última concentração tem mostrado toxicidade (Fahy, 1986, citado por Gonzalez, 2004; Vishwanath e Shannon, 2000).

Segundo Parks e Graham (1992), os crioprotetores são essenciais para a sobrevivência das células, mas o glicerol pode também ter efeitos negativos sobre a célula. Além de seu efeito osmótico sobre as células, existem evidências de que o glicerol se liga diretamente aos fosfolipídios reduzindo a fluidez da membrana, e interage com proteínas e glicoproteínas da membrana causando agrupamento dessas partículas. O glicerol causa redução da capacitância elétrica da membrana provavelmente devido a reorganizações em larga escala da estrutura da membrana, possivelmente devido à formação de junções semelhantes às junções tipo GAP. Além disso, ele induz a interdigitação dos folhetos da bicamada, alterando a fluidez da membrana e também altera a polimerização e despolimerização dos microtúbulos, o que pode afetar a membrana indiretamente.

Apesar de sua importância, há evidências de que o glicerol é tóxico ao espermatozoide e parte de sua toxicidade é devida a injúrias bioquímicas resultantes da ação direta do crioprotetor sobre os componentes subcelulares, mas danos osmóticos também podem ocorrer (Graham, 1995, citado por Celeghini, 2005). Seu efeito prejudicial é menor quando sua adição é feita a temperaturas próximas a 0ºC. Sabe-se que os espermatozoides do homem e de touros são mais resistentes à adição em uma única fase, em concentrações de 5 a 8% de glicerol, que outras espécies (Gao, Mazur e Critser, 1997; Agca e Critser, 2002; Gonzalez, 2004).

Sabe-se que o glicerol é metabolizado pelos espermatozoides do carneiro, do boi e do varrão, porém a via metabólica é diferente daquela que ocorre no fígado onde o glicerol é fosforilado por uma quinase, sendo ao

invés disso, recrutado por uma desidrogenase NADP-dependente (Holt, 2000b). O'Dell et al. (1956) demonstraram que o glicerol marcado com C^{14} é rapidamente assimilado e utilizado pelo espermatozoide bovino, com produção de $^{14}CO_2$, e a taxa de assimilação é maior na ausência do plasma seminal. Mann e White (1957) demonstraram que os espermatozoides de carneiro lavados por centrifugação metabolizam o glicerol aerobicamente produzindo ácido lático e que esta produção é maior na presença de fosfato devido à ação inibitória deste sobre a oxidação do ácido lático, causando o seu acúmulo.

Garner et al. (1999) testaram os efeitos do glicerol sobre espermatozoides bovinos resfriados a 5ºC por 24 horas por meio da associação de sondas (JC-1; SYBR-14 e PI, e FITC-PNA e SYTO-17) e observaram que o glicerol parece não apresentar qualquer efeito sobre a membrana plasmática, mas parece apresentar um efeito protetor sobre o acrossoma, porém diminuiu a proporção de espermatozoides na amostra que exibiram alto potencial mitocondrial.

Apesar de tudo, demonstrou-se claramente que o glicerol protege os espermatozoides contra os danos da criopreservação em muitas espécies e vários estudos foram realizados para testar a eficácia dessa crioproteção utilizando vários níveis de glicerol (Hammerstedt et al., 1990; Watson, 1995). Portanto, parece que o efeito protetor supera os efeitos negativos (Garner et al., 1999).

Gonzalez (2004) comparou os efeitos dos crioprotetores dimetilformamida, etilenoglicol e o glicerol na criopreservação do sêmen bovino sobre a motilidade (avaliada subjetivamente) e integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (por meio da associação das sondas fluorescentes PI, MITO e FITC-PSA, na microscopia de epifluorescência). O autor concluiu que o glicerol preserva melhor a motilidade, o vigor e a integridade das membranas dos espermatozoides, quando comparado aos outros crioprotetores utilizados. Além disso, observou-se que o etilenoglicol é superior à dimetilformamida na conservação da motilidade e das membranas dos espermatozoides bovinos.

4.10.3 A função da gema de ovo

O plasma seminal, que se mistura com os espermatozoides na ejaculação, e serve como meio de transporte para o trato genital feminino, já foi descrito como benéfico e ao mesmo tempo prejudicial para o espermatozoide. Mais precisamente, foram descritos fatores do plasma seminal que ajudam as funções espermáticas tais como a motilidade, a viabilidade e fertilidade e que facilitam a capacitação (Baas et al., 1983; Killian et al., 1993; Bellin et al., 1998; Miller et al., 1990; citados por Bergeron et al., 2004).

Entretanto, sabe-se que o plasma seminal também contém fatores prejudiciais à capacidade fertilizante, tais como fator decapacitante (Chang, 1957; Robertson, 1971) e fator inibidor da motilidade (Iwamoto e Gagnon, 1988). Além disso, o plasma seminal é prejudicial ao armazenamento do sêmen porque contém fatores que afetam negativamente a viabilidade espermática (Way et al., 2000, citado por Bergeron et al., 2004).

A maior fração protéica do plasma seminal bovino é composta por um grupo de proteínas denominadas de BSP's (*Bovine Seminal Plasma proteins*). Essas proteínas representam 65% das proteínas do plasma seminal, dentre elas destacam-se a BSP-A1/A2, BSP-A3 e BSP-30kDa. As proteínas BSP's se ligam aos fosfolipídios de colina da membrana do espermatozoide na ejaculação e potencializam a capacitação espermática, induzida pelo HDL e pela heparina, estimulando o efluxo de colesterol

e fosfolipídios da membrana do espermatozoide. Por isso, as BSP's são benéficas ao espermatozoide. Entretanto, as mesmas proteínas podem ser prejudiciais para a membrana do espermatozoide *in vitro*. O efluxo dos lipídios estimulado pelas BSP's é concentração e tempo dependente e, por isso, uma exposição contínua dos espermatozoides ao plasma seminal, que contém essas proteínas, pode ser lesivo à membrana do espermatozoide (Thérien et al., 1999; Manjunath e Thérien, 2002; Manjunath et al., 2002; Bergeron et al., 2004).

A gema de ovo de galinha (Egg Yolk- EY) é o agente mais efetivo para proteção do espermatozoide contra o choque frio e demonstrou-se que ela melhora as funções espermáticas e preserva a fertilidade após o armazenamento na forma liquida ou congelada. Apesar do uso de diluidores contendo gema de ovo por mais de 60 anos, o mecanismo envolvido na proteção pela gema de ovo contra os danos causados pelo armazenamento, resfriamento e congelamento ainda não é totalmente compreendido (Bergeron et al., 2004).

Os trabalhos de Pace e Graham (1974) e Foulkes (1977), trabalhando com a purificação de componentes da gema, demonstraram que a fração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema é o constituinte responsável pela proteção do espermatozoide contra os danos causados pelo choque frio e pelo congelamento. Acredita-se que a fosfatidilcolina (lecitina) do LDL seja uma das responsáveis por essa proteção, uma vez que ela sozinha fornece alguma proteção ao espermatozoide contra o choque frio e o congelamento (Vishwanath e Shannon, 2000; Watson, 1995).

Evidências sugerem que é necessária a molécula inteira de LDL para proteger o espermatozoide contra o choque frio. A digestão seletiva tanto da fração protéica ou lipídica não oferece a mesma proteção contra o choque frio (Watson, 1981b; Vishwanath e Shannon, 2000).

O LDL constitui cerca de dois terços dos sólidos totais da gema de ovo de galinha e está localizado na fração solúvel da gema de ovo, chamada plasma. O LDL apresenta uma densidade de 0,982 g/mL. Ele é constituído por moléculas esféricas de 17 ± 60 nm de diâmetro, com um núcleo lipídico de triglicerídios e ésteres de colesterol envolvido por um filme de fosfolipídios e proteínas (**Figura 9**). Os fosfolipídios desempenham um papel essencial na estabilidade da estrutura do LDL porque as forças de associação são essencialmente hidrofóbicas. O LDL contêm 83-89% lipídios e 11-17% de proteínas. Os lipídios do LDL são compostos de aproximadamente 69% de triglicerídeos, 26% de fosfolípidos e 5% de colesterol (Moussa et al., 2002).

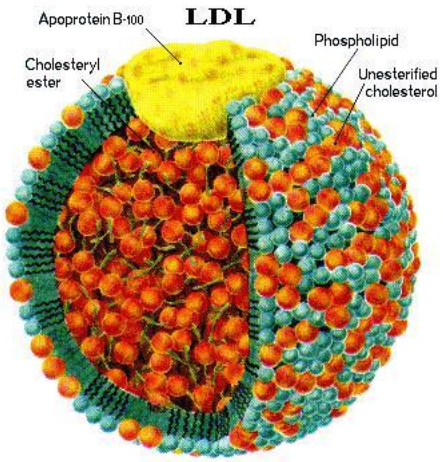


Figura 9 – Estrutura da molécula de LDL da gema de ovo.

A estrutura do LDL é baseada em um núcleo de triglicerídios envolvidos por um filme de proteínas e fosfolipídios, que apresentam sua porção polar em contato com a fase aquosa (Cook e Martin, 1969; citado por Moussa et al., 2002). Sabe-se que a gema de ovo sofre gelificação quando é submetida a um processo de congelamento e

descongelamento e que as moléculas de LDL são responsáveis por essa gelificação, enquanto que as outras substâncias da gema não participam diretamente (Wakamatu, 1982). A gelificação do LDL ocorre em temperaturas abaixo de -6ºC. O primeiro estágio desta gelificação é o rompimento da estrutura do LDL. Este rompimento é favorecido pela desidratação causada pelo congelamento e descongelamento. As interações lipídio proteína são interrompidas durante o congelamento, e as interações entre as proteínas são aumentadas. O produto da agregação das moléculas de LDL contém lipídios incluídos na sua estrutura (Tsutsui, 1988). Conseqüentemente, sob um processo de congelamento e descongelamento a molécula de LDL é rompida. Os triglicerídios e os fosfolipídios são liberados no meio, e as apoproteínas formam um gel (Moussa et al., 2002).

Vários mecanismos de proteção espermática pelo LDL da gema foram propostos. Sugeriu-se que o LDL da gema de ovo fornece proteção pela associação com a membrana do espermatozoide (Foulkes, 1977; Watson, 1981b). Por esta hipótese a proteína do LDL atua na solubilização do lipídio e na ligação deste com a membrana (Watson, 1981b; Vishwanath e Shannon, 2000). Moussa et al. (2002) sugerem que a adsorção e gelificação das apoproteínas do LDL ao redor da membrana dos espermatozoides poderia formar um filme protetor contra os cristais de gelo durante o congelamento.

Quinn et al. (1980) sugeriram que os fosfolipídios da molécula de LDL podem formar um filme ou camada protetora na superfície da membrana dos espermatozoides após a ruptura do LDL. Além disso, Graham e Foote (1987) e Trimeche et al. (1996) propuseram que os fosfolipídios do LDL poderiam substituir alguns fosfolipídios da membrana do espermatozoide, e desse modo reduzindo a temperatura de transição de fase desta. Graham e Foote (1987) observaram que a fosfatidilserina sozinha ou combinada com a fosfatidilcolina é o fosfolipídio mais efetivo para a proteção do espermatozoide (citado por Moussa et al., 2002).

Outra hipótese é que o LDL previne a perda de fosfolipídios de membrana, assim aumentando a tolerância ao choque frio (Parks e Graham, 1992), e estudos anteriores que indicam que os fosfolipídios da gema protegem os espermatozoides do choque frio sustentam essa especulação (Quinn et al., 1980, citado por Bergeron et al., 2004).

Estudos realizados por Manjunath et al. (2002) indicam que o LDL, interage especificamente com as proteínas BSP's. A ligação das proteínas BSP's ao LDL é rápida, específica e saturável. Além disso, a capacidade de ligação do LDL às BSP's é muito alta, e esta interação é estável mesmo após o congelamento/ descongelamento. Tendo em vista tal fato, os pesquisadores sugeriram que o sistema de retirada ou "limpeza" das BSP's pelas lipoproteínas da gema de ovo, durante a diluição do sêmen com diluidores contendo gema, protege os espermatozoides dos efeitos deletérios das BSP's do plasma seminal.

Parks et al. (1981) mostraram que na ausência da gema de ovo no diluidor, ocorre uma diminuição no conteúdo de colesterol e de fosfolipídios do espermatozoide durante a incubação. O trabalho de Bergeron et al. (2004) complementou os estudos de Parks et al. (1981) ao revelar que o contato com o plasma seminal resulta em perda gradual dos fosfolipídios de colina e do colesterol da membrana plasmática do espermatozoide. Mas, quando o sêmen foi diluído com gema de ovo, foi observado o efeito oposto (ganho de colesterol e fosfolipídios, e redução da associação das BSP's à superfície do espermatozoide). Uma vez que o mesmo efeito foi mimetizado quando se utilizou a LDF (fração de lipoproteína de baixa densidade da gema), os pesquisadores

concluíram que a LDF é a responsável por este efeito. Além disso, a prevenção da ligação das BSP's ao espermatozoide e do efluxo de lipídios da membrana resultou em um aumento na qualidade do sêmen (motilidade).

Bergeron et al. (2004) observaram também que quando o sêmen foi incubado a 4ºC, na presença de gema de ovo no diluidor, o ganho de colesterol e fosfolipídios de colina foi 2 vezes menor do que no sêmen incubado a 37ºC. Isto pode ser explicado pela transição de fases que ocorre nas membranas durante o resfriamento. Durante o resfriamento as membranas se tornam menos fluidas e são menos susceptíveis à troca de lipídios. É possível que a mudança na fase lipídica da membrana espermática e no filme de fosfolipídios da molécula de LDL durante o resfriamento evita parcialmente a passagem de lipídios da LDL para a membrana do espermatozoide ou a ligação do LDL ao espermatozoide. De modo semelhante, em sêmen diluído com diluidor sem gema, a perda de lipídios da membrana do espermatozoide foi 2 a 3 vezes menor em sêmen incubado a 4ºC do que no sêmen incubado a 37ºC.

Bergeron et al. (2004), a partir deste estudo, sugerem que a gema de ovo nos diluidores protege os espermatozoides de duas formas. Primeiro, a associação do LDL com as BSP's protege o espermatozoide evitando que essas proteínas do plasma seminal se liguem ao espermatozoide e causem danos à membrana pela remoção de lipídios. Segundo, os lipídios da fração de lipoproteína de baixa densidade ou a molécula inteira de LDL se associariam à membrana, preservando a integridade da membrana plasmática durante a preservação do sêmen.

4.10.4 A substituição da gema de ovo pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL)

Nos últimos anos, vêm surgindo uma demanda crescente para a substituição da gema de ovo nos diluidores de sêmen devido a descobertas de substâncias presentes na gema que inibem a respiração dos espermatozoides ou diminuem a motilidade (Pace e Graham, 1974; Watson e Martin, 1975; Moussa et al., 2002), além do risco sanitário envolvido (contaminação bacteriana ou por micoplasmas, e por isso possível fonte de endotoxinas; Bousseau et al., 1998). Portanto, seria de grande benefício a retirada dessas substâncias prejudiciais e a adição apenas do agente crioprotetor da gema de ovo (Moussa et al., 2002).

A possibilidade de substituir a gema de ovo pelo LDL é interessante para a criopreservação do sêmen bovino, o que torna relevante a realização da sua extração. Como vantagens temos: a padronização do componente que está sendo adicionado ao meio, permitindo a produção de um "diluente quimicamente definido", já que existe variabilidade na composição da gema de acordo com a alimentação e a genética animal da ave; a eliminação de componentes indesejáveis, que causam efeitos deletérios ao espermatozoide; a eliminação do risco sanitário, ao considerar que a gema é um potencial carreador de patógenos; e além disso, a retirada dos glóbulos de gordura que interferem com o exame microscópico do sêmen diluído (Vishwanath e Shannon, 2000; Amirat et al., 2005; Neves, 2008).

Até recentemente, a técnica mais utilizada para a extração de LDL era a ultracentrifugação por gradiente de densidade. Esta técnica de isolamento fornece uma excelente pureza de LDL, no entanto, é muito demorado porque requer longos períodos de ultracentrifugação (várias horas a 40.000-300.000×g) e não fornece grandes quantidades de LDL (Moussa et al., 2002). As outras técnicas principais são derivadas do método desenvolvido por Raju e Mahadevan (1974)

que utilizam cromatografia de troca aniônica para purificar o LDL da gema após várias centrifugações à 27.000×g. Esta técnica produz LDL com uma pequena contaminação com livetinas, e não é útil para aplicação a uma escala industrial. Portanto, o uso do LDL em larga escala para produção industrial não era possível até recentemente, devido à ausência de um método de purificação eficiente (Moussa et al., 2002).

Entretanto, Moussa et al. (2002) desenvolveram um método simples e rápido, utilizando a precipitação pelo sulfato de amônia e posterior diálise, para extrair LDL da gema de ovo, com pureza de 97% e rendimento de 67%, e que pode ser reproduzido em escala industrial. A partir desta técnica, várias pesquisas (Moussa et al., 2002; Amirat, 2004; Amirat, 2005; Vera-Munoz et al., 2009) demonstraram que a utilização do LDL em substituição a gema de ovo na composição de diluidores apresenta vantagens em relação à qualidade espermática e a fertilidade do sêmen criopreservado.

Moussa et al. (2002) testaram, em bovinos, várias porcentagens de LDL na composição de um diluidor e compararam com um diluidor comercial original a base de gema (Triladyl®) e outro a base de lecitina de soja (Biociphos®). A análise computadorizada da motilidade demonstrou que a motilidade e as características do movimento foram melhoradas pela substituição da gema pelo LDL. A concentração de 8 % de LDL apresentou os melhores resultados, com 57,3% de motilidade total em comparação com 51% para Biociphos® e 27,1% para o Triladyl®, além de apresentar maiores valores para VSL e LIN em relação ao Triladyl®. Concluiu-se que a concentração ótima de LDL é 8% e que um diluidor contendo LDL extraído da gema de ovo pode ser utilizado como meio crioprotetor com melhores resultados do que os atuais diluidores comerciais (Moussa et al., 2002).

Amirat et al. (2004), comparando a fertilidade *in vitro* do sêmen bovino criopreservado utilizando um diluidor contendo LDL e outro comercial Optidyl® (com 20% de gema), observaram que a motilidade espermática pós-descongelamento (54,4% vs 30,2%), e a taxa de clivagem (63,0% vs 54,8%) foram significativamente maiores com LDL do que utilizando o Optidyl®. Concluindo que o LDL pode ser uma ótima alternativa para meios quimicamente definidos.

Em outro estudo Amirat et al. (2005) compararam as alterações provocadas pelos diluidores Triladyl®, pelo LDL e Biociphos® em diferentes etapas do processo de criopreservação. Após diluição e resfriamento a 4 º C por 1, 4 e 24 h, no sêmen congelado e pós-descongelamento. Alterações nas estruturas celulares foram visualizadas por microscopia eletrônica. Mais de 80% dos espermatozoides apresentaram danos às membranas após incubação por 4 h no diluidor Triladyl®, enquanto apenas 3% e 47% das células foram lesadas no LDL e Biociphos®, respectivamente. Este último diluidor foi prejudicial à integridade da membrana plasmática, após incubação de 4 h ou mais. Quanto à ultra-estrutura dos espermatozoides congelados, as principais diferenças entre as amostras relacionavam-se ao tamanho e a aparência das veias do diluidor congelado, e poucas lesões foram adicionadas ao processo de congelamento em qualquer profundidade das palhetas. Após o descongelamento, a motilidade do sêmen foi duas vezes maior ($P < 0,05$) no Biociphos (64%) e LDL (61%) em relação ao Triladyl (32%) e as células apresentavam menos alterações no LDL. Concluiu-se que o diluidor a base de LDL ofereceu melhor proteção para o armazenamento de espermatozoides congelados.

Vera-Munoz et al. (2009) estudaram os efeitos da alta diluição (baixa concentração espermática/dose) sobre a motilidade e a

integridade da membrana plasmática, utilizando dois diluidores comerciais (Triladyl® e Bioxcell®) e um diluidor a base de LDL. Para cada diluidor foram testadas três diluições diferentes, $120x10^6$, $60x10^6$ e $20x10^6$ espermatozoides/mL. Os resultados permitiram concluir que as altas diluições diminuem a sobrevivência dos espermatozoides pós-criopreservação nos três diluidores testados. No entanto, o diluidor com 8% de LDL (em matéria seca) ofereceu uma melhor proteção do que o Triladyl® e o Bioxcell®. O diluidor 8% LDL apresentou 53, 41,8 e 29,3% de motilidade para as três diluições, respectivamente.

Recentemente, visando estender o uso do LDL para as centrais de IA, Amirat-Briand et al. (2010) realizaram testes de fertilidade à campo. Pela primeira vez, foram obtidas prenhezes através da inseminação artificial com sêmen criopreservado em um diluidor a base de LDL. Neste estudo observou-se que a motilidade total pós-descongelamento foi maior para o diluidor LDL (58,3%) do que para o diluidor Tris-gema (46%), e a motilidade progressiva foi 2x superior para o diluidor LDL, porém, não houve diferença significativa entre as taxas de prenhez entre o diluidor LDL (59,2%) e o diluidor controle, Tris-20% de gema (65,3%).

4.10.5 O uso do colesterol na criopreservação do sêmen bovino

O colesterol apresenta vários efeitos sobre as membranas, incluindo a estabilização da membrana, redução da permeabilidade da membrana, facilitação das características morfológicas da membrana e permite as interações célula-célula, influencia a transição de fases da membrana, proporciona um microambiente adequado (químico e/ou físico) para as proteínas associadas à membrana, além de atuar como um antioxidante de membrana (Crockett, 1998; citado por Mocé et al., 2010a). A proporção colesterol: fosfolipídio é um importante determinante da fluidez e estabilidade da membrana a baixas temperaturas. O colesterol modula a fluidez das membranas, interagindo com as cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídios, impedindo a transição de fases e criando um estado de fluidez intermediária acima e abaixo da temperatura de transição de fase (Parks et al., 1981). Isto mantém os fosfolipídios em um arranjo aleatório, lamelar à medida que a temperatura diminui (Amann e Pickett, 1987). Em modelos de membranas, o aumento na proporção colesterol: fosfolipídios amplia a transição de fase, reduz a perda de membrana e a separação de fases da membrana. Assim, o tratamento dos espermatozoides antes da criopreservação com colesterol pode reduzir a sensibilidade da membrana plasmática aos danos de resfriamento, eliminando ou pelo menos minimizando a separação de fase lateral dos lipídios (Watson, 1981a; Mocé et al., 2010a).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, produtos da degradação do amido, compostos por unidades glicosídicas que adotam uma conformação em cadeira (Figura 10). São capazes de formar complexos de inclusão com diversas moléculas que aparentemente precisam satisfazer apenas uma condição – devem se encaixar inteira ou parcialmente na cavidade da ciclodextrina (Challa et al., 2005). O método utilizado para a síntese dos complexos depende das propriedades dos componentes das substâncias que são complexadas. Substâncias hidrossolúveis são dissolvidas diretamente em soluções aquosas e substâncias insolúveis em água devem ser dissolvidas em éter, clorofórmio, benzeno ou outro solvente orgânico (Saenger, 1980; citado por Oliveira, 2007).

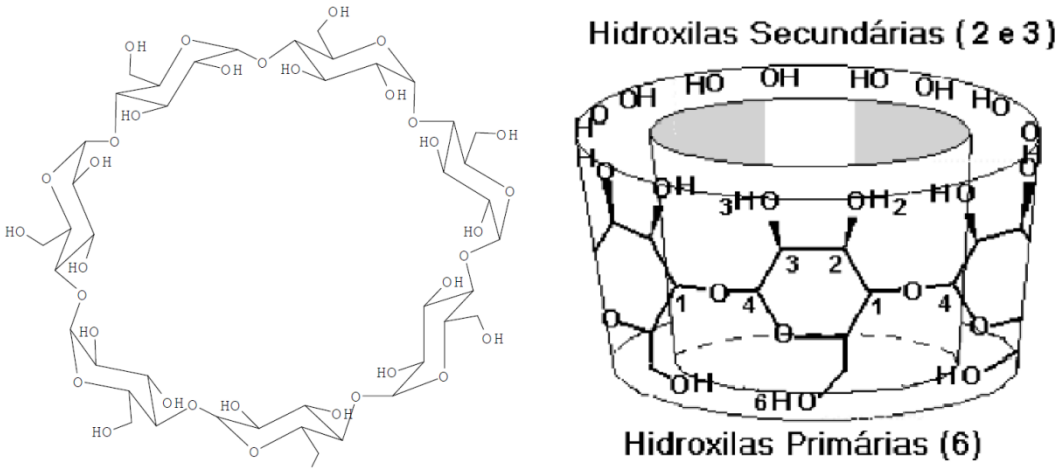


Figura 10 – Fórmula estrutural de uma ciclodextrina (βCD) e observação da estrutura da ciclodextrina na forma de um cone truncado (Fonte: Challa et al., 2005).

Esses compostos são capazes de dissolver substâncias hidrofóbicas, aumentando sua solubilidade em soluções aquosas. *In vitro*, as β-ciclodextrinas têm alta afinidade por esteróides quando comparado a outros lipídios e, devido à relativamente alta especificidade pelo colesterol, foi sugerido que estes compostos podem ser efetivos na modificação do metabolismo do colesterol *in vivo* (Yancey et al., 1996).

A habilidade da metil-β-ciclodextrina e seu complexo de inclusão com colesterol em alterar o conteúdo desse esteroide da membrana plasmática é devida à formação de uma nova reserva contendo colesterol na fase aquosa. Esta reserva é rapidamente envolvida num equilíbrio entre o colesterol ligado à membrana e o colesterol complexado com a ciclodextrina. A incubação da membrana plasmática com a ciclodextrina isoladamente provoca a retirada do colesterol, com o equilíbrio voltado para o lado do complexo de inclusão (Atger et al., 1997). Inversamente, a incubação da membrana plasmática desprovida de colesterol com o complexo de inclusão (CLC) leva à restauração do colesterol da membrana (Klein et al., 1995; Oliveira, 2007).

A inclusão de colesterol ao diluidor foi relatada como uma alternativa para aumentar a estabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides de várias espécies durante o resfriamento, assim, melhorando a qualidade pós-descongelamento do sêmen (Combes et al., 2000; Purdy e Graham, 2004a,b; Mocé et al., 2010a,b; Oliveira et al., 2010). A incorporação e remoção do colesterol das membranas celulares foram relatadas para vários tipos celulares, incluindo os espermatozoides. Em particular, as ciclodextrinas (heptasacarídios cíclicos constituídos por unidades de b (1-4) glicopiranose) apresentam um centro hidrofóbico capaz de incorporar lipídios (Amorim et al., 2009). Essas moléculas são capazes de remover o colesterol das membranas, induzindo a capacitação espermática (Choi e Toyoda, 1998). As ciclodextrinas podem ser usadas para alterar o teor de colesterol das membranas celulares (Christian et al., 1997) e, se forem pré-carregadas com colesterol este será inserido nas membranas (Navratil et al., 2003). Quando os espermatozoides do garanhão (Combes et al., 2000), do touro (Purdy e Graham, 2004a,b) e do carneiro (Mocé et al., 2010b) foram tratados com ciclodextrinas carregadas com colesterol (CLC) antes do congelamento, apresentaram maiores taxas

de sobrevivência do que os não tratados (controle) (Amorim et al., 2009).

De modo geral, o tratamento de espermatozoides com ciclodextrinas carregadas com colesterol (CLC) antes da criopreservação melhora as taxas de crio-sobrevivência avaliadas tanto pela motilidade quanto pela viabilidade (porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra). Estas melhorias podem ser tão pequenas quanto 2%, ou pode ser tão alta quanto 24%. No entanto, a maioria dos estudos relata um aumento de 10-20% na taxa sobrevivência. Porém, o benefício do tratamento com CLC sobre as taxas de sobrevivência é diferente para o sêmen de diferentes espécies, para diferentes linhagens dentro de uma espécie, para machos diferentes e para sêmen submetido a tratamentos diferentes (ex. sêmen sexado) (Mocé et al., 2010a).

Em bovinos, várias pesquisas foram realizadas visando desenvolver um protocolo para utilização da CLC na criopreservação do sêmen (Purdy e Graham, 2004a,b; Mocé e Graham, 2006; Amorim et al., 2009). Purdy e Graham (2004a) testaram várias concentrações de CLC na criopreservação com diluidores a base de gema de ovo (Tris e citrato de sódio) e concluíram que as maiores porcentagens de espermatozoides móveis (60%) e viáveis (55%) foram obtidas utilizando a concentração de 1,5 mg/120 x 10^6 sptzs em comparação com o diluidor controle (42 e 46%, respectivamente). Os efeitos benéficos da adição de CLC foram observados independentemente da temperatura de incubação (22 ou 37 ºC) e os efeitos máximos foram obtidos quando os espermatozoides foram incubados com CLC por apenas 15 min. A quantidade de colesterol que foi incorporada pelos espermatozoides aumentou com o aumento da concentração de CLC de forma linear, e cada espermatozoide incorporou a mesma quantidade de colesterol. Além disso, o colesterol se incorporou a todas as membranas do espermatozoide. O tratamento com a CLC aumenta o teor de colesterol do espermatozoide cerca 2-3 vezes em bovino, (Purdy e Graham, 2004a), e esse colesterol adicional aumentaria a proporção colesterol: fosfolipídeos destes espermatozoides para proporções (> 0,8) que é semelhante a dos espermatozoides das espécies que são resistentes ao choque térmico. Portanto, o tratamento com CLC diminuiria os danos aos espermatozoides causados pelas mudanças de temperatura durante a criopreservação (Mocé et al., 2010a).

Mocé e Graham (2006) testaram o efeito da adição de CLC a amostras de sêmen bovino com diferentes concentrações espermáticas (120-2000 x 10^6 espermatozoides/mL) e o efeito de diferentes taxas de congelamento. Estes pesquisadores observaram que não houve efeito da concentração ou das taxas de congelamento, porém a adição de CLC ao ejaculado não diluído resultou em maior sobrevivência espermática em relação ao controle (62 vs. 45%; $P < 0.05$).

Uma das primeiras etapas na capacitação espermática é o efluxo de colesterol da membrana plasmática dos espermatozoides, após isso uma série de eventos acontece e torna os espermatozoides capazes de reagir o acrossoma e fertilizar o oócito (Cross, 1998). Portanto, adicionar colesterol a membrana para melhorar a crio-sobrevivência pode retardar a capacitação espermática (Mocé et al., 2010a; Purdy e Graham, 2004b). Levando isto em consideração, Purdy e Graham (2004b) testaram o efeito da adição de CLC na capacitação espermática, na reação acrossômica, e na fertilidade do sêmen bovino. Estes pesquisadores observaram que os espermatozoides de sêmen fresco tratado com CLC sofrem a capacitação e/ou a reação acrossômica induzida em taxas inferiores ao controle. Porém, após a criopreservação, as amostras tratadas com CLC e o controle sofreram

capacitação e reação acrossômica a taxas similares. A principal preocupação, porém, é se o tratamento com CLC afetaria a fertilidade *in vitro* ou *in vivo*. A utilização de espermatozoides tratados com CLC ou controle, ambos criopreservados, para a fertilização in vitro de oócitos bovinos resultou em taxas de clivagem e formação de blastocistos semelhantes. Além disso, quando utilizados na IA em novilhas, com baixa dose inseminante (750 mil espermatozoides/dose), as taxas de prenhez do controle e do tratamento com CLC (50 e 59%, respectivamente; P> 0,05) também foram semelhantes (Purdy e Graham, 2004b). Outros estudos, utilizando métodos de avaliação in vitro da fertilidade, observaram que os espermatozoides tratados com CLC apresentaram maiores taxas de penetração de oócitos e/ou maior número de espermatozoides ligados à zona pelúcida ou membranas perivitelínica de ovos de galinha, por exemplo, Amorim et al. (2009) obtiveram valores de 157 para o tratamento com CLC e de 85 para o controle (P< 0,05).

No entanto, deve-se ressaltar que mesmo que apenas taxas de fertilidade semelhantes sejam obtidas, a tecnologia da CLC pode ser útil para o sêmen de indivíduos que normalmente não apresentam bons resultados na criopreservação, pois é capaz de aumentar o número de espermatozoides vivos pós-criopreservação. Isso pode ser especialmente importante em vários tipos de programas de melhoramento, quando indivíduos que apresentam alto valor genético podem ser eliminados do programa de melhoramento genético devido ao fato de seu sêmen não satisfazer os parâmetros mínimos de qualidade espermática após a criopreservação, bem como para a criação de bancos de recursos genéticos, quando é obrigatório manter a variabilidade genética tanto quanto possível (Mocé et al., 2010a).

4.11 Métodos de avaliação do sêmen criopreservado

O objetivo primário de todas as análises de sêmen é determinar o potencial fertilizante de uma amostra, utilizando métodos rápidos e que não sejam dispendiosos. Por muitos anos, os cientistas procuraram desenvolver métodos laboratoriais que pudessem predizer com precisão a capacidade fertilizante de uma amostra de sêmen. Este objetivo, entretanto, provou ser muito difícil de se conseguir, devido à natureza complexa do problema (Graham, 2001).

As correlações entre a fertilidade da amostra de sêmen e os resultados dos testes laboratoriais variaram muito entre vários estudos revisados (correlações entre fertilidade e motilidade variaram de 0,15 a 0,84; entre fertilidade e avaliações morfológicas variaram de 0,06 a 0,86; e entre fertilidade e viabilidade da célula variaram de 0,33 a 0,66) (Graham, 2001).

Nenhum teste laboratorial isolado, medindo apenas um atributo, pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen, uma vez que, para ser capaz de fertilizar o oócito e permitir o desenvolvimento embrionário, os espermatozoides precisam apresentar diversos atributos (motilidade, acrossoma intacto, habilidade de se ligar a zona pelúcida, habilidade de se ligar ao oolema, etc) (Graham, 2001; Celeghini, 2005; Celeghini et al., 2007).

Para garantir a fertilidade, o sêmen deve apresentar características mínimas de concentração, motilidade e características morfológicas dos espermatozoides, as quais são parâmetros clássicos na avaliação de amostras de sêmen. Entretanto, estudos (Verstegen et al., 2002; Celeghini, 2005; Arruda, 2007) reportam que este tipo de análise manual é impreciso, mesmo quando executado por investigadores experientes. As análises são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores. Esta imprecisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças

na implementação de padrões para a avaliação (Verstegen et al., 2002; Celeghini, 2005).

A alta variabilidade na eficiência dos processos de congelamento de sêmen e de fecundação *in vitro* tem levado as avaliações andrológicas a técnicas mais apuradas, no que diz respeito à identificação do potencial fecundante do espermatozoide do touro no trato genital feminino (Vale Filho et al., 2003). O espermatozoide é uma célula complexa que se torna infértil quando um dos vários aspectos bioquímicos ou morfológicos se encontra afetado. Normalmente a avaliação de somente um desses aspectos não garante a condição de normalidade dos outros, sendo que a combinação de vários fatores em uma análise multifatorial seria mais apropriada para o diagnóstico da funcionalidade do espermatozoide (Melo, 1999).

Uma grande diversidade de biotécnicas vem sendo desenvolvida para a avaliação seminal, das quais pode-se citar sistemas de avaliação computadorizada das características seminais, uso de sondas fluorescentes para a avaliação das estruturas espermáticas por microscopia de epifluorescência ou sistema de citometria de fluxo, testes hiposmóticos, avaliação de proteínas do plasma seminal, produção de espécies reativas de oxigênio, entre outras (Arruda et al., 2004, citado por Celeghini, 2005).

4.11.1 A avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA)

A motilidade espermática por microscopia óptica é provavelmente a avaliação mais comumente realizada em sêmen criopreservado. Os resultados são subjetivos e é necessária uma boa experiência do examinador para uma avaliação confiável (Leite, 2008). Entretanto, segundo Graham (1996a) a porcentagem de espermatozoides móveis avaliada visualmente, não é altamente correlacionada com fertilidade (citado por Melo, 1999; Juhász et al., 2000). Segundo Picket (1993), a motilidade espermática é um dos principais métodos de avaliação da preservação de espermatozoides e constitui um elemento importante na estimativa da viabilidade espermática.

Na tentativa de tornar as avaliações da qualidade espermática mais objetivas e detalhadas, foram desenvolvidos equipamentos para a análise computadorizada do sêmen (Verstegen et al., 2002; Leite, 2008). A análise computadorizada de parâmetros espermáticos (do inglês: Computer Assisted Semen Analysis – CASA) foi introduzida a mais de 20 anos (Jasko et al., 1988), e desde então, é usada regularmente no processo de avaliação de sêmen em vários laboratórios. Pelo uso do CASA podem ser obtidos vários parâmetros específicos de motilidade, descrevendo os movimentos do espermatozoide de maneira mais detalhada. Além disso, a classificação em espermatozoides móveis e imóveis pode ser baseada em limites de velocidade bem definidos. Paralelamente às tentativas de melhorar a performance dos sistemas de análise computadorizada CASA, é importante investigar a relevância biológica dos parâmetros do CASA no contexto da predição do potencial de fertilidade do macho, um conhecimento que é de crucial importância para a compreensão da biologia da fertilização (Larsen et al., 2000).

A relação entre a motilidade espermática analisada por computador e a forma convencional foi estudada por Kolibianakis et al. (1992), que observaram que a análise pelo CASA foi altamente correlacionada com o método convencional ($r = 0,89$; $P<0,001$). Os autores 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 (citado por Arruda, 2000).

As relações entre fertilidade e os diferentes parâmetros de motilidade do espermatozoide analisados pelo CASA ainda precisam ser determinadas (Juhász et al., 2000). A avaliação automatizada da motilidade espermática é de grande interesse devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides. Dentre esses parâmetros, a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido correlacionados com penetração no muco cervical, penetração em oócitos de hamster e resultados de fertilização *in vitro* (Januskauskas et al., 1999; Arruda et al., 2007).

Farrell et al. (1998) tentaram correlacionar os parâmetros avaliados pelo CASA com a fertilidade. Entre um a cinco parâmetros avaliados pelo CASA foram correlacionados individualmente com a fertilidade do touro, definida como as taxas de não retorno aos 59 dias corrigidas para efeitos de vaca e do rebanho. A porcentagem de espermatozoides móveis explicou apenas uma fração pequena da variação total da fertilidade (r^2 = 0,34). Entretanto altos valores de r^2 (0,68 a 0,98) foram obtidos quando 2 a 5 variáveis foram utilizadas em equações de regressão múltipla. Segundo estes autores os resultados são promissores, e futuros testes vão determinar mais precisamente qual dessas variáveis do CASA são mais úteis na estimativa do potencial de fertilidade do touro.

Os aparelhos utilizados no sistema CASA variam amplamente e são baseados na microscopia 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 espermatozoides 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 espermatozoide (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 espermatozoides (Verstegen et al., 2002).

Segundo Mortimer (1997) e Arruda (2000), os parâmetros gerados pelo sistema CASA mais utilizados são: ***Motilidade Total*** (MOT), que é expressa em porcentagem e é a razão das células móveis na concentração espermática total; ***Motilidade Progressiva*** (PROG) 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 espermatozoide ao longo do seu caminho curvilinear, calculada pela somatória das distâncias ao longo da trajetória e então corrigida pelo tempo; ***Velocidade do Trajeto*** (VAP) expressa em μm/s, corresponde à velocidade média ininterrupta do caminho da célula, sendo a indicação do comprimento da trajetória geral do espermatozoide 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 uma comparação da linha reta com o caminho médio do espermatozoide, é a indicação da relação entre o espaço percorrido e a trajetória total do espermatozoide, calculada pela relação entre VSL/VAP x 100 (%); ***Linearidade*** (LIN), expressa em porcentagem, é uma comparação da linha reta com a trajetória curvilínea do espermatozoide, é calculada pela razão entre VSL/VCL x 100 (%) (Figura 11).

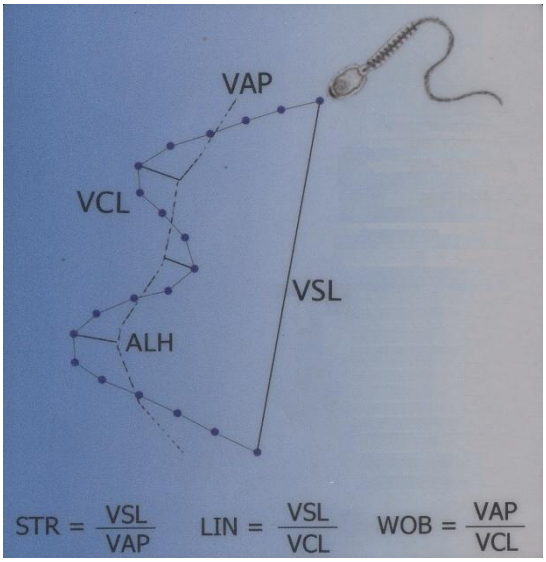


Figura 11- Principais parâmetros do movimento espermático avaliados pelo CASA. (Fonte: http://www.micropticsl.com/eng/index.html)

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 ***Frequência de Batimentos Flagelares*** (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 espermatozoide gira a cada início de batimento (Mortimer, 1997; Arruda, 2000; Zaffalon, 2009).

4.11.2 Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal.

A manutenção da capacidade fertilizante do sêmen depende da integridade e funcionalidade de diferentes estruturas celulares, e isto dificulta o desenvolvimento de uma única técnica para a avaliação do potencial fertilizante que consiga avaliar todos esses atributos simultaneamente (Graham, 2001; Celeghini et al., 2007). Porém, quando dados de vários métodos de avaliação espermática são utilizados em conjunto, consegue-se obter altas correlações com o potencial fertilizante da amostra de sêmen (Graham, 2001).

A fluorescência é um indicador sensível e específico do estado de certas moléculas (oxidadas x reduzidas, ionizadas x não ionizada, livres x ligadas), podendo ser aplicada como um meio para medir mudanças metabólicas em células vivas (Haugland, 2001). O emprego de sondas fluorescentes na andrologia tem o objetivo de avaliar a integridade e função dos compartimentos da célula espermática (Celeghini, 2005; Celeghini et al., 2007).

Os corantes fluorescentes proporcionam avaliações mais objetivas das células espermáticas em relação aos métodos clássicos de coloração com microscopia óptica (Graham et al., 1990). As células espermáticas coradas com fluorescência podem ser avaliadas quanto aos aspectos morfológicos como quanto aos funcionais, sem a interferência do meio extracelular (Gonzalez, 2004; Leite, 2008).

4.11.2.1 Integridade da membrana plasmática

As membranas exercem um papel fundamental na manutenção da capacidade fertilizante do espermatozoide. A membrana plasmática é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico, atuando como uma barreira entre o meio intra e extracelular. Lesões nessa estrutura podem levar a perda da homeostase celular, levando à morte celular (Flesh e Gadella, 2000). Conseqüentemente, a integridade da membrana plasmática é crucial para a sobrevivência do espermatozoide no trato genital feminino, e para manter a capacidade fertilizante (Parks e Graham, 1992; Celeghini et al., 2007).

A determinação da integridade da membrana pode ser feita com a utilização de corantes fluorescentes (sondas) impermeáveis à membrana, com afinidade ao DNA. Assim, as células não coradas são consideradas com membrana plasmática intacta. O Hoeschst 33258 (H258), YoPro-1, iodeto de propídio (PI), homodímero de etidio (EthD-1), ToPro-3 e TOTO são exemplos desse tipo de sonda que já foram testadas em células espermáticas. Uma outra alternativa para o estudo da integridade de membrana é o uso de sondas acetiladas. Devido aos seus radicais acetil, essas sondas são anfipáticas e assim conseguem passar pela membrana intacta da célula viva, sendo imediatamente deacetiladas por esterases intracelulares, tornando a sonda impermeável. Assim, as células intactas apresentam coloração, enquanto as células mortas não são coradas, pois a sonda consegue sair facilmente da célula. Porém, é possível haver ligação dessas sondas a células deterioradas com lesões da membrana. Exemplo dessas sondas são o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o SYBR-14 (Silva e Gadella, 2006; Raphael, 2007).

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 (Hallap et al., 2006; Zaffalon, 2009).

O Hoechst 33342 atua como um marcador de membrana plasmática intacta corando a célula de azul. 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 espermatozoide presentes nos diluidores. Possui excitação de 350 nm e emissão de 461 nm (Celeghini, 2005; Hallap et al., 2006).

Devido à alta toxicidade do brometo de etídio, principalmente para quem o manipula, sua aplicação tem sido restringida. Porém, o iodeto de propídio (PI), um corante fluorescente com propriedades similares passou a ser utilizado. O iodeto de propídio vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade de membrana, seja isoladamente ou associada a outro corante fluorescente para avaliar a membrana plasmática. Esta sonda possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada. Possui, respectivamente, excitação e emissão no comprimento de onda de 488 nm/ 675 nm (Graham et al., 1990; Celeghini, 2005; Arruda et al., 2007).

É possível utilizar simultaneamente essas sondas, como SYBR-14 ou CFDA com PI ou EthD-1, para detectar células com membrana plasmática intacta e lesada, respectivamente (Silva e Gadella, 2006). Esta técnica de coloração dupla classifica a população de espermatozoides em 3 categorias: 1) Espermatozoides vivos, emitindo fluorescência verde, CFDA ou SYBR-14 (+); 2) espermatozoides mortos com núcleo emitindo fluorescência

vermelha, PI (+) e CFDA ou SYBR-14 (-); 3) espermatozoides lesados, emitindo fluorescência verde e vermelha, PI (+) e CFDA ou SYBR-14 (+) (Juhász et al., 2000; Silva e Gadella, 2006).

4.11.2.2 Integridade da membrana acrossomal

Para fertilizar um oócito, o espermatozoide deve possuir um acrossoma intacto. A reação acrossômica caracteriza-se pela liberação das enzimas acrossômicas, que é um evento essencial para a penetração do espermatozoide na matriz extracelular da zona pelúcida e para a fusão com a membrana plasmática do oócito (Juhász et al., 2000; Flesh e Gadella, 2000; Celeghini et al., 2007).

A integridade do acrossoma pode ser verificada por diferentes técnicas de fluorescência. O caráter glicoprotéico dos componentes acrossomais fornece outro meio de mensurar a integridade acrossomal, por preenchimento fluorescente da matriz acrossomal de espermatozoides com acrossoma lesado com lecitinas marcadas (Graham et al., 1990).

A integridade acrossomal pode ser medida utilizando-se lecitinas de plantas conjugadas a fluoróforos. As lecitinas cojungadas se ligam especificamente a cadeias de carboidratos de glicoproteínas presentes no acrossoma. As mais utilizadas são a aglutinina do *Pisum sativum* (PSA), da *Arachis hypogea* (PNA) e da *Concanavalia ensiformis* (ConA). A PSA se liga aos resíduos de α-manose e α-galactose de glicoproteínas da matriz acrossomal enquanto o PNA se liga a residos de β-galactose associados à membrana externa do acrossoma. Os espermatozoides que possuem membranas intactas não permitem a entrada e ligação dessas lecitinas, portanto, quando essas lecitinas são utilizadas sem permeabilização das células, elas se ligam à membrana de acrossomas lesados (Juhász et al., 2000; Graham, 2001; Silva e Gadella, 2006; Raphael, 2007; Celeghini et al., 2007).

A aglutinina PSA, quando conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) marca com sucesso o acrossoma espermático na cor verde amarelado, facilitando sua visualização e a identificação dos acrossomas lesados, sendo utilizado em espermatozoides de várias espécies, incluindo a espécie bovina (Graham et al., 1990; Celeghini, 2005; Arruda et al., 2007; Raphael, 2007).

Comprovando a eficiência e especificidade do FITC-PSA na avaliação da integridade de membrana acrossomal, Souza (2001) comparou quatro diferentes técnicas para exame de integridade do acrossoma: câmara úmida por microscopia de contrate de fase e de interferência diferencial, coloração por Trypan Blue/Giemsa e microscopia de epifluorescência utilizando o FITC-PSA, para sêmen eqüino criopreservado. Verificou que a técnica de epifluorescência com FITC-PSA foi a mais eficiente para detectar lesões de acrossoma (citado por Celeghini, 2005; Arruda et al., 2007).

4.11.3 Avaliação da estabilidade (fluidez) da Membrana Plasmática

A membrana espermática passa por grandes modificações para a fertilização. As moléculas de superfície da membrana passam por reorientações e modificações quando os fatores de capacitação ativam o espermatozoide. Essas mudanças são necessárias, pois possibilitam ao espermatozoide se ligar à zona pelúcida (Gadella, 2008; Zaffalon, 2009). 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 da membrana plasmática. A merocianina 540 possui excitação em torno de 540 nm (Colenbrander et al., 2002; Hallap et al., 2006; Zaffalon, 2009).

4.11.4 A associação de sondas fluorescentes e a citometria de fluxo

Segundo Tartagliole e Ritta (2004), quanto mais parâmetros espermáticos são avaliados em uma amostra de sêmen bovino criopreservado, maior será o valor no prognóstico de fertilidade *in vitro*. As associações de sondas fluorescentes permitem avaliar simultaneamente vários compartimentos da célula espermática (Arruda et al., 2007; Celeghini et al., 2007; Raphael, 2007).

Várias associações foram desenvolvidas e testadas por pesquisadores diferentes nos últimos anos. Entre essas destacam-se a associação de PI com SYBR-14, desenvolvida por Garner et al. (1986), que permite a visualização de células com membrana plasmática lesada (coradas em vermelho) e as células com membrana plasmática intacta (núcleo verde). Outra associação é a do PI com o diacetado de carboxifluoresceína (CFDA), desenvolvida por Harrison e Vickers (1990) e a associação tripla SYBR-14, PI e PE-PNA, que permite a avaliação das membranas na presença de partículas de gema de ovo, por citometria de fluxo (Nagy et al., 2003).

Celeghini (2005), com o objetivo de desenvolver uma técnica rápida e precisa para a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e função mitocondrial, testaram e validaram quatro técnicas de associação de sondas para bovinos, analisadas por microscopia de epifluorescência. Dentre as técnicas utilizaram as associações: PI, FITC-PSA e MitoTracker Green FM; PI, FITC-PSA e CMXRos ou PI, FITC-PSA, e JC-1. Dentre essas técnicas, a associação PI, FITC-PSA e JC-1 foi considerada a melhor, pois permite separar as populações de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial de maneira mais clara.

Os problemas de se avaliar múltiplas características do espermatozoide são o tempo e o custo dessas técnicas. Utilizando métodos de citometria de fluxo, associados às sondas fluorescentes, múltiplas características, incluindo viabilidade celular, integridade acrossomal, e função mitocondrial, podem ser avaliadas simultaneamente nas células espermáticas. Além disso, essas avaliações quando feitas por microscopia de epifluorescência, apenas avaliam de 100 a 200 células. Entretanto há um ganho considerável quando o uso de sondas fluorescentes para análise de organelas é combinado com a citometria de fluxo, já que a citometria permite a avaliação de dezenas de milhares de células em menos de 1 minuto com precisão, a um custo razoável. Embora a citometria de fluxo seja uma ferramenta poderosa para avaliação de várias características, esta técnica não permite avaliar todos os atributos que o espermatozoide precisa para fertilizar o oócito (Graham et al., 1990; Graham, 2001; Arruda et al., 2007; Celeghini et al., 2007).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Locais e período experimental

As etapas de extração e purificação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), avaliação da composição da lipoproteína, preparação dos meios diluidores e avaliação da osmolaridade destes meios foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG, localizada em Belo Horizonte – MG, no período de Janeiro a Julho de 2011.

Os testes preliminares para estabelecer a eficiência e a melhor concentração de glicerol para os meios de criopreservação foram realizados com animais (n =7, Nelore) pertencentes ao Instituto de Zootecnia de São Paulo, (Centro de Pesquisa de Bovinos de Corte) no município de Sertãozinho-SP, no período de junho a julho de 2011.

As atividades de coleta, avaliação pré-criopreservação, diluição e criopreservação das amostras de sêmen foram realizadas na Central de Inseminação Artificial da empresa ABS Pecplan, localizada no município de Uberaba-MG, no período de 27 de julho a 28 de setembro de 2011.

Os testes laboratoriais de integridade de membranas por citometria de fluxo e de análise computadorizada da motilidade espermática (CASA) foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Campus de Pirassununga – SP, no período de Janeiro a fevereiro de 2012.

5.2 Extração das Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) da gema de ovo

Para a preparação dos meios à base de Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) purificada da gema de ovo, foi utilizada a técnica de extração proposta por Moussa et al. (2002). Utilizaram-se ovos frescos de galinha (obtidos logo após a postura), fornecidos pela Granja SuperGema Inagro (Fazenda do Moinho, Pedro Leopoldo-MG). Os ovos tiveram sua casca higienizada com solução detergente, e posteriormente com álcool 70%, e após secos com papel toalha, a casca foi quebrada manualmente. A gema foi separada do albúmen manualmente e então cuidadosamente rolada sobre papel filtro para remoção da chalaza e dos restos de albúmen impregnados na membrana vitelina. Posteriormente, a membrana vitelina foi rompida com uma lâmina estéril e a gema foi coletada em um Becker de vidro (estéril) mantido sob refrigeração (5ºC) em caixa de isopor com gelo picado.

Para obtenção e fracionamento do plasma, a gema foi diluída 2x (ou seja, na proporção 1:1 (v:v)) com uma solução salina isotônica a 0,17M de NaCl e então homogeneizada por 1h em agitador magnético sob refrigeração (5ºC). Após essa etapa, a solução foi então centrifugada (centrifuga refrigerada, Sorvall® Dupont, modelo RC2-B) a 10.000×g por 45 min a 5ºC. O *pellet* obtido, que correspondia aos *grânulos* da gema (constituídos de 70% de lipovitelinas, que correspondem às lipoproteínas de alta densidade – HDL; Neves, 2008), foi descartado, e o sobrenadante (plasma) foi novamente centrifugado a 10.000×g por mais 45 min a 5ºC para completa remoção dos grânulos. O sobrenadante obtido, chamado plasma, teve seu pH mensurado e corrigido para 8,7 com hidróxido de sódio (NaOH) microperolado. O volume final foi medido utilizando-se proveta graduada de vidro.

A partir do volume obtido, foi calculada a quantidade de sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) em pó (sólido) que deveria ser acrescentada diretamente ao plasma para obter uma solução final a 40% de saturação de sulfato de amônio. Para isto, foi utilizada como ferramenta a calculadora virtual de sulfato de amônio disponível no site da empresa Encor Biotechnology Inc. (2012). A vantagem desta ferramenta é que ela fornece a quantidade exata de sulfato de amônio para qualquer volume, levando em consideração a temperatura de adição, já que esta influencia na saturação (exemplo: para um volume de 800 mL de solução a 0% deve-se acrescentar 186,71 g de $(NH_4)_2SO_4$ para se obter uma solução a 40% de saturação a 4ºC; volume final = 899,14 mL).

O sulfato de amônio em pó foi acrescentado lentamente à solução, sob agitação (agitador magnético) constante à 4ºC. Essa

temperatura foi obtida colocando-se o Becker com a solução em uma caixa de isopor com gelo picado. O pH (8,7) e a temperatura (4°C) foram monitorados e mantidos até o final da diluição. Após a completa adição do sulfato de amônio, a solução foi mantida em agitação constante por mais 1h a 4ºC para precipitar as livetinas. A solução foi então centrifugada a 10.000×g por 45 min a 5ºC para separar o sobrenadante do sedimento. O sedimento foi descartado.

O sobrenadante foi envasado em membrana de diálise (Spectra/Por® 4; WMCO: 12-14 KDa, diâmetro 29mm., cod. 132706; Spectrum Laboratories) (Figura 12) e dialisado em água destilada deionizada por cerca de 24 h sob refrigeração (4°C), com troca de água a cada 3h, para completa eliminação do sulfato de amônio. Após a diálise, o dialisado (solução) foi colocado em um Becker para distribuição em tubos de centrifuga (50 mL, cod. 3119-0050, Nalgene, USA). A solução foi centrifugada a 10.000×g por 45 min a 4ºC, e após centrifugação formou-se uma porção flutuante aderida à parede do tubo, que correspondia à lipoproteína de baixa densidade (LDL). O LDL foi então cuidadosamente coletado com uma espátula para evitar a contaminação com a porção líquida (Figura 13).

O LDL extraído foi armazenado a 5°C até a preparação dos meios de criopreservação (no mesmo dia). Do LDL extraído uma alíquota foi coletada para análise química e preservada à -20°C até o momento da análise. Foram realizadas as análises de determinação do teor de matéria seca (MS), teor de lipídios totais e a dosagem de proteína total. Baseado no teor de MS calculou-se a quantidade de matéria natural de LDL em gramas para se obter a concentração de 8% (p/v de MS) de LDL no diluidor (**Anexo 1**). Essa quantidade de 8% de LDL, é a concentração ótima de LDL para os diluidores de sêmen bovino encontrada por Moussa et al. (2002).

5.2.1 Análises químicas do LDL

5.2.1.1 Determinação do teor de matéria seca

Foi analisado o teor de matéria seca da gema e das amostras de lipoproteínas de baixa densidade. Os pesa-filtros foram identificados e pesados vazios com tampa em balança de precisão. Adicionou-se aos mesmos uma quantidade conhecida (mL) de cada amostra, pesando novamente o conjunto. Do valor obtido subtraiu-se o valor do pesa-filtro vazio, obtendo o peso da amostra fresca (Paf). Os conjuntos foram colocados em uma bandeja de metal, e levados à estufa de secagem à temperatura de 104°C, permanecendo por 24 horas. Após serem retirados da estufa, os pesa-filtros foram tampados e mantidos dentro de dessecadores até seu resfriamento total, quando foram novamente pesados em balança de precisão. Do peso do conjunto pós-secagem foi subtraído o peso do pesa-filtro vazio, obtendo-se o peso da amostra após a secagem (Pas). A subtração de Pas do Paf resulta no valor da água perdida na secagem (Pa), que foi aplicado à fórmula: X = Pa x 100/ Paf, onde X é a porcentagem de água perdida. Subtraindo-se esse valor de 100, obteve-se a porcentagem de matéria seca da amostra. Foram feitas três análises por extração.

5.2.1.2 Determinação do teor de lipídios

A determinação do teor de lipídios presentes na gema do ovo e no LDL foi feita pelo método de Soxhlet (IUPAC, 1979), utilizando três réplicas de 3g por amostra obtida de cada extração (foram realizadas 3 extrações). Os resultados finais foram expressos em porcentagem de lipídios na matéria fresca.



Figura 12 – Exemplos de modelos de membranas e equipamentos que podem ser utilizados para o processo de diálise para a purificação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema de ovo. (Fonte: http://www.spectrumlabs.com/dialysis/RCsacks.html).

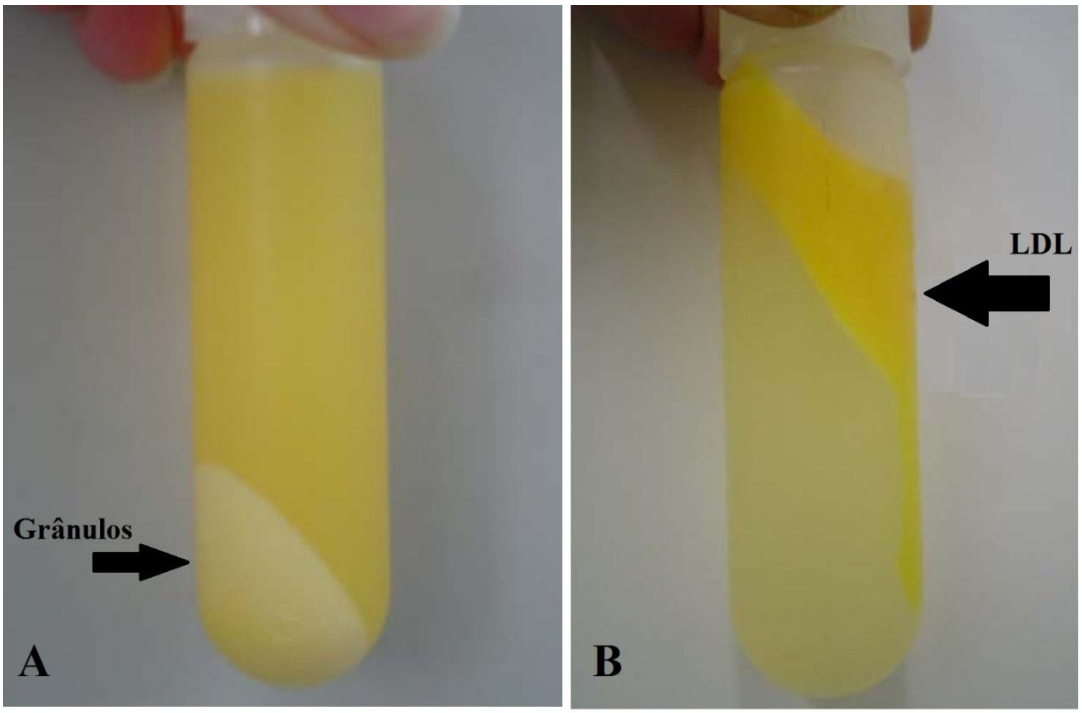


Figura 13 – Etapas da extração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema de ovo: A) Após a primeira centrifugação a separação da gema em plasma e grânulos (Pellet); B) Após a diálise, última etapa da purificação, após a última centrifugação ocorre a separação do LDL na forma de um gel flutuante amarelado.

5.2.1.3 Dosagem de proteínas

O conteúdo protéico da gema e das lipoproteínas de baixa densidade foi determinado pelo método de Lowry (1951). Utilizou-se a albumina sérica bovina (BSA) como padrão, na concentração de 1mg/mL, que foi diluída, em duplicata, em diferentes concentrações. As amostras de gema e de lipoproteínas foram primeiramente diluídas em 1mL de PBS 0,01M dentro de microtubos (eppendorfs), misturadas em vórtex e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. Adicionou-se a cada tubo de ensaio 1mL de reagente de cobre, agitando o conteúdo imediatamente e vigorosamente, deixando-o em repouso por dez minutos. Posteriormente, adicionou-se 100µL de reagente de Fenol, agitando-se imediatamente e vigorosamente a solução, deixando-a em repouso por mais dez minutos até a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 660 nm. Foram realizadas três análises por extração, sendo os resultados expressos em mg/mL. Os resultados das análises químicas encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Teor de matéria seca (%), lípides (%) e proteína (mg/mL) da gema de ovo e do LDL extraído da gema (média de 3 extrações).

Análises	Gema	LDL	LDL (%) MS
Matéria Seca	50,5 ± 0,2	39,5 ± 0,3	100
Lípides	30,2 ± 2,4	33,7 ± 0,5	85,3
Proteínas	7,1 ± 1,5	5,7 ± 1,6	14,4

Média ± desvio-padrão; MS (Matéria seca).

5.3 Preparação das Ciclodextrinas

A metil-β-ciclodextrina (MβCD) foi pré-carregada com colesterol para a preparação do complexo de MβCD-colesterol como descrito por Purdy e Graham (2004a). Resumidamente, em um tubo de vidro, 200 mg de colesterol (cod. C3045-5g, Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio. Em um segundo tubo de ensaio, 1 g de Metil-β-ciclodextrina (C4555-10g, Sigma-Aldrich) foi dissolvida em 2 mL de metanol. Após essa etapa, uma alíquota de 0,45 mL da solução de colesterol foi adicionada à solução de ciclodextrina, e a mistura foi agitada com bastão de vidro até que a solução combinada tornou-se clara. A solução combinada de MβCD-colesterol (CLC) foi então despejada em uma placa de Petri e os solventes foram retirados por meio de um fluxo de gás nitrogênio. Os cristais resultantes foram deixados para secar por um período adicional de 24 h (à 22°C) e posteriormente retirados da placa de Petri e armazenados em um recipiente de vidro à temperatura ambiente (22ºC) até sua utilização. Para facilitar a manipulação o CLC foi aliquotado em tubos de microcentrifuga de 1 mL (tipo eppendorf) em alíquotas de 50, 25 e 12,5 mg de CLC através da pesagem em balança analítica.

Para incorporação do colesterol aos espermatozoides, foi preparada uma solução de trabalho por meio da adição de 50 mg de CLC (MβCD-colesterol) a 1 mL de meio diluidor Tris (200 mM Tris, 71 mM ácido cítrico, 55 mM Frutose, pH=7,4; 300 mOsm) sem lipoproteínas ou gema, a 37°C e homogeneizada com agitador tipo vórtex, imediatamente antes de se acrescentar ao sêmen. Após à homogeneização foi adicionado à alíquota de sêmen apenas o volume calculado da solução de trabalho (dose 1,5 mg de CLC/ $120x10^6$ sptz), e incubado por 15 min a 32°C.

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

5.4 Preparo dos meios diluidores

Os meios diluidores foram preparados tendo como base o meio Tris-gema (fração única) proposto por Leite et al. (2010), porém com algumas modificações (acréscimo de sulfato de estreptomicina - 0,0067g/100 mL de solução e redução de 1% na concentração de Glicerol).

Foram preparados 4 diluidores:

1) Tris-Gema (controle);
2) LDL (Tris – 8% LDL);
3) LDL $^{+ CLC}$ (8% LDL + Pré-tratamento com CLC);
4) L-CLC (0,8% LDL + Pré-tratamento com CLC). (L – de *Low concentration – baixa concentração de LDL*)

Os diluidores, preparados em condições de assepsia, com pH ajustado (6,5), foram divididos em alíquotas de 40 mL em tubos Falcon de 50 mL, e congelados à – 20°C (freezer) até o momento do uso. Protocolos semelhantes de congelamento do diluidor existem na literatura (Van Wagtendonk-De Leew, 2000). A composição dos meios diluidores está resumida na tabela 3, e detalhadamente no **Anexo 1.**

5.5 Animais e manejo

Foram utilizados 15 touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), andrologicamente normais, pertencentes ao plantel da Central de Inseminação Artificial da empresa ABS Pecplan (**Anexo 7**), com idades entre 2 a 6 anos, selecionados pela motilidade espermática (motilidade > 70% e vigor >4) e morfologia espermática dentro do grupo de reprodutores da raça disponíveis no plantel da central, todos sob o mesmo regime de coleta de sêmen. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais e de manejo, em piquetes individuais de capim Braquiária, com disponibilidade de água e sal mineral *ad libidum*.

5.6 Coleta e análise do sêmen pré-criopreservação

As coletas de sêmen foram realizadas por meio de vagina artificial, sendo realizada higienização externa do prepúcio com água e sabão, e internamente com solução fisiológica de 0,9% de NaCl, antes de cada coleta para evitar contaminações do sêmen (**Anexo 7**).

Tabela 3 - Composição dos meios diluidores fração única para criopreservação de sêmen bovino com e sem Ciclodextrina Carregadas com Colesterol (CLC).

Nº	Diluidor	Ingredientes	LDL (%)	Gema (%)	Glicerol (%)
1	**Controle** (Tris-gema)	200 mM Tris, 71 mM ácido cítrico, 55 mM frutose	-	20	6
2	**LDL**	200 mM Tris, 71 mM ácido cítrico, 55 mM frutose	8	-	6
3	**LDL$^{+ CLC}$** (associação)	200 mM Tris, 71 mM ácido cítrico, 55 mM frutose + 1,5 mg de CLC/ 120 x10^6 sptz (Pré-tratamento)	8	-	6
4	**L-CLC** (baixa [LDL])	200 mM Tris, 71 mM ácido cítrico, 55 mM frutose + 1,5 mg de CLC/ 120 x10^6 sptz (Pré-tratamento)	0,8	-	6

* Todos os diluidores possuem na formulação antibióticos (Penicilina G potássica - 0,028 g/100 mL; e sulfato de estreptomicina - 0,0067g/100 mL de solução final). Sptz – espermatozoides.

Logo após a coleta, foram realizadas as análises físicas e morfológicas de rotina. Cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor, e quanto à morfologia espermática. Todo material utilizado na coleta e avaliação do sêmen foi mantido aquecido a 37ºC, para evitar choque térmico e alterações das características do sêmen. No momento da coleta, a vagina artificial e o tubo de coleta estavam pré-aquecidos, para evitar o choque térmico. O volume foi avaliado pela leitura direta no tubo de coleta graduado e também por método gravitacional (em balança analítica). A concentração foi avaliada por meio de espectrofotômetro com diluidor automático de sêmen (Accucell® bovine photometer, Modelo n° 704, IMV Technologies, France) (**Anexo 7**). A diluição de 1:100 para avaliação da concentração foi feita automaticamente (40µL de sêmen + 3960µL de solução salina NaCl) pelo equipamento em uma cubeta de 4 mL, que após a leitura fornecia a concentração da amostra em milhões de sptz/mL.

A motilidade e vigor foram avaliados subjetivamente, logo após a coleta, em preparação de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas, a 37ºC), por meio de microscopia de contraste de fase (modelo Eclipse E50i, Nikon®, Tokyo, Japão), em aumento de 100x; a motilidade foi expressa em porcentagem de espermatozoides móveis; enquanto que o vigor, que se refere à velocidade progressiva das células em movimento, foi classificado em escores de 1 a 5, sendo o escore 1 o mais lento e o escore 5 correspondendo ao mais rápido movimento progressivo uniforme.

Para a avaliação da morfologia espermática uma alíquota do ejaculado foi diluída em formol-salina tamponada, previamente aquecido (37ºC), para fixação e avaliado posteriormente, em laboratório, por meio de preparações úmidas, sob microscopia de contraste de fase (Microscópio Nikon Eclipse E50i), com aumento de 1000x, contando-se 200 células.

Estas avaliações foram feitas segundo os procedimentos descritos no Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Somente as amostras de sêmen que atendiam aos valores estabelecidos, para o sêmen bovino, pelo CBRA foram utilizadas neste experimento, ou seja, com motilidade total ≥70%, defeitos maiores ≤15%, e defeitos totais ≤30%. Os resultados das morfologias encontram-se no **Anexo 6**.

5.7 Diluição e Criopreservação do sêmen

Neste experimento foi utilizado apenas 1 ejaculado por touro. Após a avaliação da motilidade e vigor das amostras de sêmen, o ejaculado de cada touro foi dividido em 4 alíquotas de mesmo volume, em tubos cônicos de 50 mL identificados com o tipo de diluidor utilizado, e foram diluídas, utilizando-se para cada uma delas um diluidor diferente (tabela 3), que foi descongelado no dia do uso e mantido a 32°C. Um importante aspecto da tecnologia das CLCs é que estas precisam ser co-incubadas com os espermatozoides em um meio sem lipídios, uma vez que estes interferem na transferência de colesterol para os espermatozoides (Purdy e Graham, 2004a).

Nos tratamentos com CLC (3 e 4), foi acrescentado ao sêmen fresco (ainda não diluído) a quantidade da solução trabalho de CLC (calculada de acordo com o volume e concentração espermática da alíquota) correspondente a 1,5 mg de CLC/120x10^6 espermatozoides. As alíquotas foram então incubadas por 15 min. a 32ºC antes da adição do diluidor de criopreservação. Esta etapa constituiu o pré-tratamento com CLC. Após esta etapa, as alíquotas de sêmen foram diluídas com o diluidor

correspondente, pelo método *one-step* (diluidor fração única). Inicialmente o sêmen foi diluído na proporção 1:1 (v/v) e então, após a incubação por 5 minutos, foi adicionado o volume final calculado do diluidor de criopreservação. A diluição foi realizada lentamente em banho-maria à temperatura de 32ºC, atingindo a concentração final de 30×10^6 sptz/mL e os tubos foram identificados quanto ao tipo de diluidor e o touro.

Em seguida, os tubos contendo as quatro alíquotas de sêmen diluído foram resfriados lentamente em recipiente plástico com água a 32ºC (por aprox. 25 min) até atingir a temperatura ambiente (25ºC) e então as alíquotas foram envasadas à temperatura ambiente em palhetas de 0,5 mL (15×10^6 sptz/palheta) (IMV, L'Aigle, França) que foram vedadas com álcool polivinílico. As palhetas foram previamente identificadas quanto ao tratamento (diluidor e tempo de equilíbrio) e o número do touro.

Para o resfriamento e congelamento do sêmen foi utilizado um sistema automatizado de criopreservação do sêmen portátil (modelo TK-3000® compacta, TK Equipamentos para Reprodução, Uberaba, Brasil) composto por aparelho programável, equipado com porta-palhetas de aço-inox, unidade ou tubo de resfriamento e caixa térmica para nitrogênio líquido, e com uma bateria para casos de queda de energia.

As palhetas foram transferidas e divididas (de acordo com a identificação da palheta), em três máquinas de congelamento do mesmo modelo, uma vez que em cada máquina realizou-se um tempo de equilíbrio diferente (tempos de 0, 4 e 6 horas). Foram utilizadas as mesmas curvas de resfriamento e congelamento para todos os diluidores e para todos os tratamentos, variando-se apenas o tempo de equilíbrio a 5ºC (cada máquina possuía o mesmo número de palhetas para cada diluidor).

Para o resfriamento as palhetas foram colocadas nos porta-palhetas, e cada um foi acondicionado no tubo de resfriamento correspondente, permanecendo até alcançar 5ºC. Os aparelhos foram programados para realizar o resfriamento a partir da temperatura ambiente e seguindo uma curva de resfriamento de 0,25ºC/min até 5ºC, com duração em torno de 1h e 20 min. Cada máquina realizou um tempo de equilíbrio diferente (0, 4 e 6 h). Ao final de cada tempo de equilíbrio, cada porta-palhetas foi removido para uma caixa térmica contendo nitrogênio líquido (nível de 7 cm), na qual realizou-se a curva de congelamento com uma taxa de -20ºC/min de 5ºC até -120ºC (**Anexo 2**).

Após atingir a temperatura de -120ºC, as palhetas foram removidas dos porta-palhetas e imersas no nitrogênio líquido. Por fim as palhetas foram colocadas em racks identificadas pelo nome do touro e tratamento e então armazenadas em nitrogênio líquido (-196º C), em botijões criogênicos até o momento de realização das análises pós-descongelamento. Assim, ficaram estabelecido 12 tratamentos, sendo 4 diluidores e 3 tempos de equilíbrio.

5.8 Avaliações do sêmen Pós-descongelamento

Para cada análise realizada pós-descongelamento foram utilizadas duas palhetas de cada tratamento de um mesmo touro. Procurou-se, assim, retirar o efeito de palheta. O descongelamento foi realizado da mesma forma para todos os tratamentos. As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37ºC por 30 segundos. Após o descongelamento cada amostra foi colocada em um microtubo de 1,5 mL (tipo Eppendorf), homogeneizada e avaliada quanto às características de motilidade e detecção da população hiperativa por sistema computadorizado (CASA), e as análises de integridade das membranas plasmática e acrossomal, peroxidação

lipídica e estabilidade da membrana plasmática por citometria de fluxo.

5.8.1 Avaliação computadorizada das características de motilidade e hiperativação espermática

Com o intuito de comparar o padrão de motilidade dos espermatozoides nos diferentes tratamentos, as amostras foram examinadas pelo sistema de análise computadorizada do sêmen (CASA) utilizando o aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser (HTM-IVOS, Versão 12.3, Hamilton Thorne Research, Beverly, Massachusetts, USA, **Anexo 7**). Para a análise do movimento espermático utilizou-se o programa *Animal Motility*, que foi previamente ajustado (setup) para a análise de sêmen bovino (**Anexo 3**).

Para a análise foi utilizada a câmara de Makler, na qual foram colocados 5 µL de sêmen e realizada escolha manual dos campos de leitura e análise, sendo selecionados no mínimo 10 campos por amostra. As características de 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), frequência de batimento flagelar (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 espermatozoide foi considerado hiperativado quando possuía VCL ≥180, LIN ≤45, ALHmax >10. Na figura 14 estão apresentados os valores, a trajetória e o deslocamento da cabeça de um espermatozoide considerado hiperativado (Exemplo de um espermatozoide hiperativado "Tela" do programa Edit/Sort).

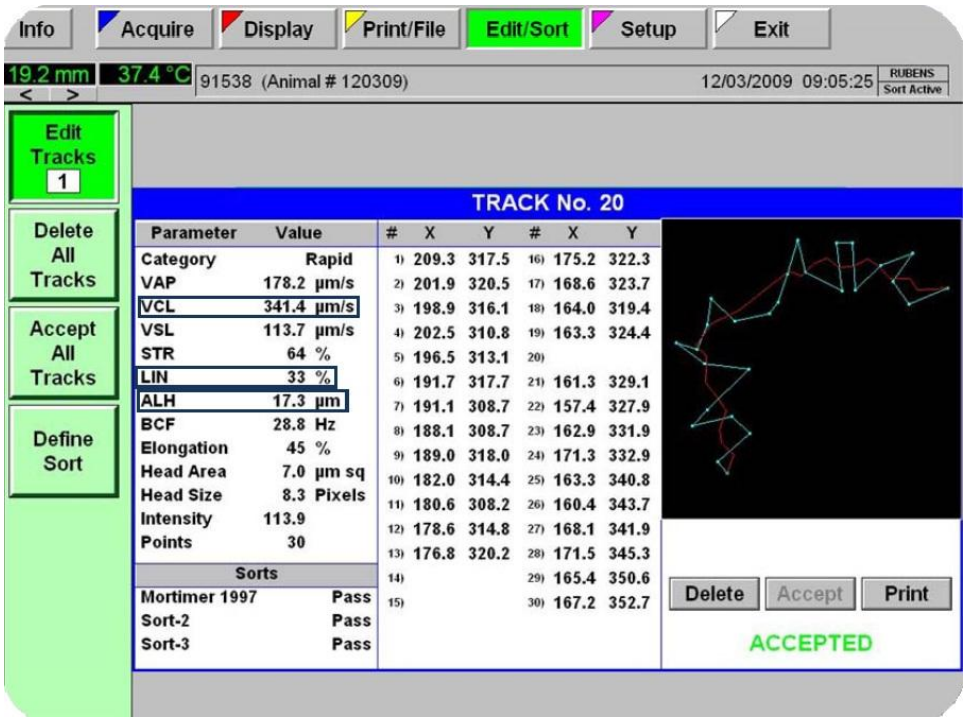


Figura 14 - Exemplo de um espermatozoide hiperativado. Tela do programa Edit/Sort do aparelho HTM-IVOS, versão 12.3, Hamilton Thorne. (Fonte: Zaffalon, 2009).

5.8.2 Análises por citometria de fluxo

Antes da realização do experimento foi realizado o ajuste (compensação) do citômetro de fluxo, como descritos a seguir. Para essas análises foi utilizado o citômetro de fluxo FACSaria (Becktson-Dickeson®, Sunnyvale, CA, USA) (**Anexo 7**), equipado com laser de argônio (Modelo Sapphire 488-20, Coherent®), o laser UV (355nm) e os filtros C (Long Pass 595nm / Band Pass 610/20nm), D (LP 556nm / BP 575/26nm) e E (LP 502 nm / BP 530/30nm).

Para a compensação no citômetro de fluxo foram utilizadas amostras de sêmen bovino criopreservado. Foram separadas duas amostras de 500 µL cada, sendo que uma foi submetida ao *flash frozen*, que consiste em submeter a amostra a três ciclos de congelamento rápido seguido de descongelamento lento, no intuito de lesar os espermatozoides (Raphael, 2007). Dessa forma, uma amostra continha a maioria dos espermatozoides lesados pelo *flash frozen* enquanto a outra apresentava uma proporção de espermatozoides íntegros. Em seguida, as amostras foram diluídas em meio TALPm, para se obter a concentração de 5 x 10^6 sptz/mL, e então foram subdivididas e corados com as sondas Hoechst 33342; Iodeto de propídio; FITC-PSA; Yo-Pro-1, Merocianina 540; C11-BODIPY$^{581/591}$, cujos protocolos estão descritos adiante (**Anexos 4 e 5**). A utilização da sonda Hoechst 33342 teve como objetivo corar o DNA das células para que não houvesse a contagem de forma equivocada de partículas com o mesmo tamanho e granulosidade do espermatozoide, presentes nos diluidores (Figura 15).

As amostras coradas foram encaminhadas para o citômetro de fluxo. Primeiramente foi analisada uma amostra sem corantes, para que assim fosse determinado o local específico (*gate*) onde a maioria dos espermatozoides se encontrava no gráfico gerado pela análise da amostra, sendo que este *gate* foi estipulado como padrão para a análise das amostras marcadas pelas sondas. Em seguida foram analisadas as amostras coradas. Todas as sondas foram ajustadas no aparelho de forma a identificar, com precisão, os espermatozoides com alterações das membranas devido à criopreservação. Os testes foram repetidos até a obtenção de resultados coerentes. Assim, o melhor ajuste (compensação) obtido para cada sonda foi estipulado como padrão, para que fosse possível a realização das análises do experimento.

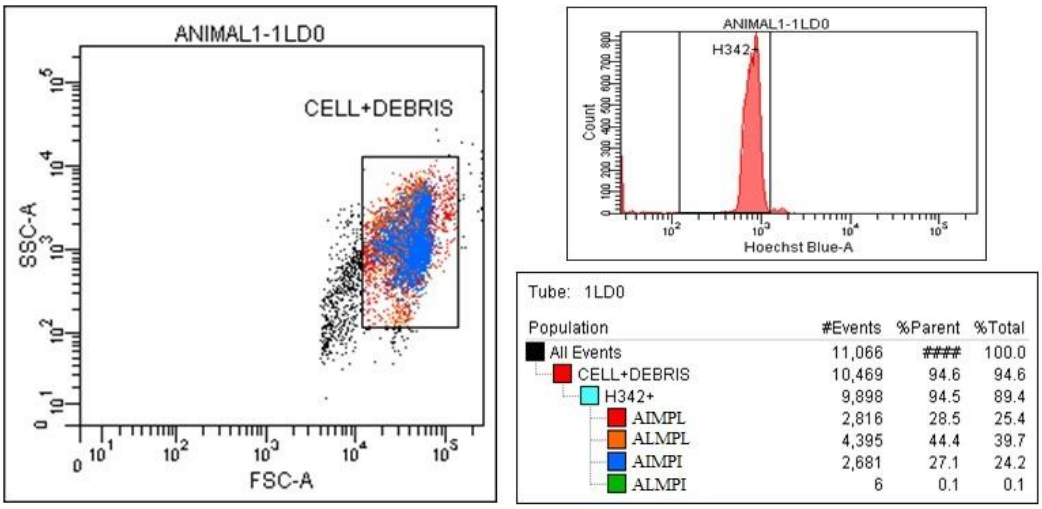


Figura 15 – Gráfico de pontos demonstrando a compensação e a formação do *gate*, onde se encontram os espermatozoides (os pontos em vermelho são partículas do diluidor). O histograma demonstra o pico de fluorescência do Hoescht, e o quadro apresenta as diferentes populações de células para a associação H33342 + PI + FITC-PSA.

5.8.3 Análises da integridade das membranas plasmática e acrossomal

Para as análises pela citometria de fluxo, uma alíquota de 250 µL de sêmen de cada amostra foi diluída com o volume de 1250µL de meio TALP sperm modificado (TALPm; **Anexos 4**) em tubos graduados (15 mL) previamente aquecidos (37°C), obtendo-se a concentração de 5 x 10^6 sptz/mL, no volume final de 1500 µL. Em seguida para cada associação de sondas foi retirada uma alíquota de sêmen diluído em TALPm.

Para análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal uma alíquota de 150 µL do sêmen diluído (5 x 10^6 sptz/mL) foi colocada em microtubos (1,5 mL) contendo 2µL de Hoechst 33342 (H33342; 5 mg/mL, H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e incubada por 10 minutos a 37°C. Passado o período de incubação, foram adicionados à amostra 3µL de Iodeto de Propídio (PI; 0,5 mg/mL, cod. P4170, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA), juntamente com 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). Estas sondas foram utilizadas com os seguintes objetivos: corar as células com membrana plasmática lesada (IP positivo) e com a membrana acrossomal reagida (FITC-PSA positivo). (Andrade, 2009).

Após 10 min. de incubação a 37°C, os espermatozoides foram diluídos com 150 µL de TALPm e transferidos para tubos graduados de 15 mL (37°C). Com isso, as amostras passaram a ter uma concentração de 2,5 x 10^6 sptz/mL no momento de serem analisadas pela técnica de citometria de fluxo. Todas as amostras tiveram 10.000 células analisadas. A Figura 16 apresenta um exemplo de gráfico de pontos e tabela de porcentagem gerados pelo *software* BD FACSDiva 6.0 após a contagem da amostra. A coloração diferençou a população espermática em quatro categorias, que podem ser vistas na figura 16.

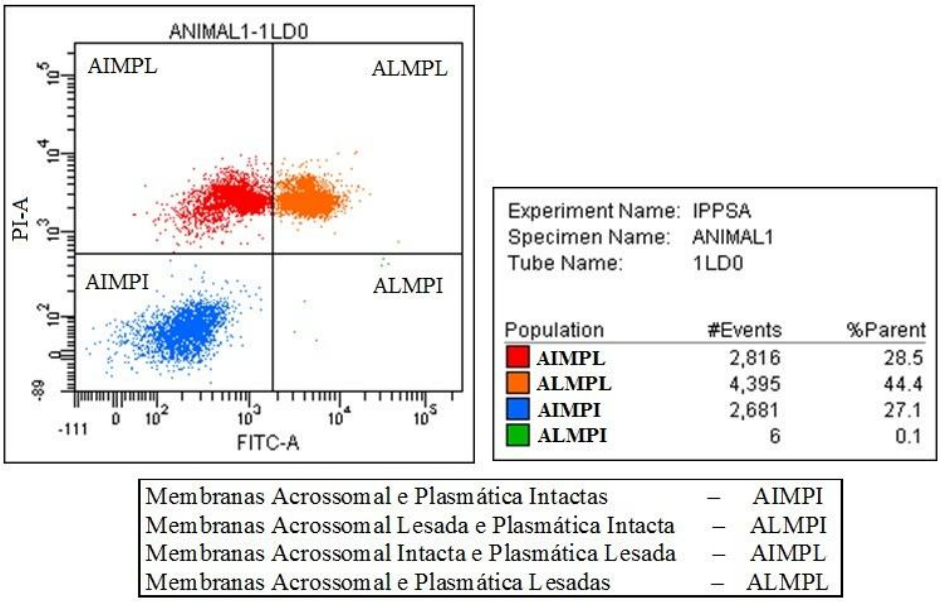


Figura 16 - Exemplos de gráfico de pontos e tabela de porcentagens originadas pelo citômetro de fluxo. Amostra corada com a associação H33342, PI e FITC-PSA, permitindo a classificação dos espermatozoides bovinos em quatro categorias.

5.8.4 Avaliação da peroxidação das membranas espermáticas

Para análise da peroxidação das membranas, para cada tratamento, uma alíquota de 499,5 µL do sêmen diluído em meio TALPm (5 x 10^6 sptz/mL) foi adicionada a um microtubo de 1,5 mL previamente aquecido (37°C), e corada 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. Após esta incubação, foram transferidos 145 µL desta solução para outro microtubo e adicionado 2 µL de H33342 (5mg/mL) sendo incubado novamente por 10 minutos a 37°C. Em seguida, adicionaram-se 3 µL de PI (0,5 mg/mL) como marcador das células com membrana plasmática lesada. Após 5 minutos de incubação a 37°C, os espermatozoides foram diluídos com a adição de 150 µL de TALPm e transferidos para tubos graduados de 15 mL (37°C). Com isso, as amostras apresentavam uma concentração de 2,5 x 10^6 sptz/mL no momento de serem analisadas pela citometria. Foram analisadas 10.000 células por amostra. A Figura 17 apresenta exemplos de gráfico de pontos e de histograma gerados pelo *software* após a contagem da amostra. As células viáveis (PI negativo) e coradas com a sonda C11-BODIPY$^{581/591}$ foram analisadas quanto à média da emissão de fluorescência captada no fotomultiplicador com *long pass* de 502 e *band pass* de 530±15 nm (Figura 17b), esta faixa captada corresponde às células que estão sofrendo ação da peroxidação (Andrade, 2009).

5.8.5 Avaliação da estabilidade (fluidez) da membrana plasmática

Para a análise da estabilidade da membrana plasmática pela técnica de citometria de fluxo (Rathi et al., 2001), uma alíquota de 147 µL da amostra de sêmen diluído em TALPm (5 x 10^6 sptz/mL) foi colocada em um microtubo (1,5 mL) previamente aquecido (37°C) e foram então adicionados 2 µL de Hoechst 33342 (5 mg/mL) e incubado por 10 min. 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

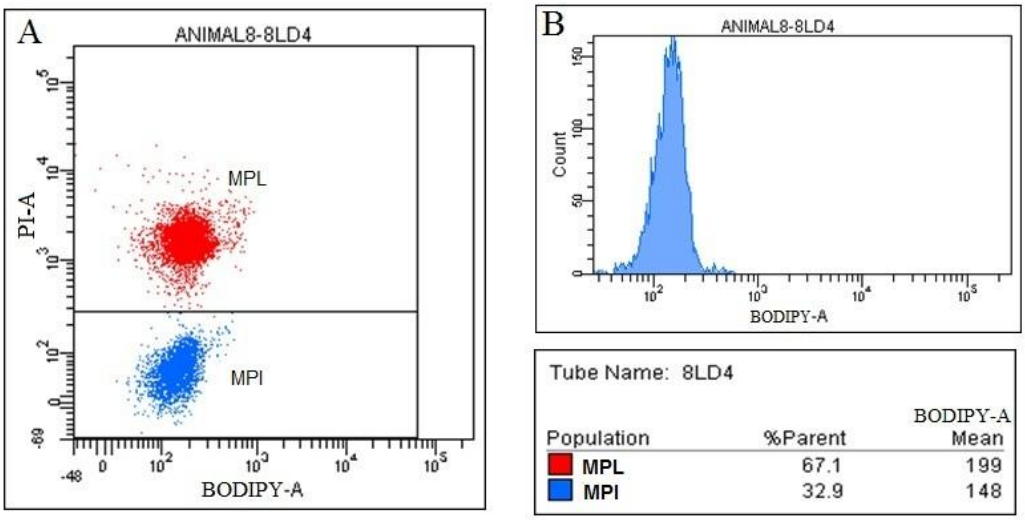


Figura 17 - Gráfico de pontos (A) gerado pela análise por citometria de fluxo em amostra corada com as sondas C11-BODIPY, H33342 e PI. No gráfico de pontos podem-se observar duas categorias, sendo que o quadrante MPI contém os espermatozoides com a membrana plasmática íntegra, selecionados para a avaliação da intensidade da peroxidação das membranas. O histograma (B) apresenta a população MPI que está sendo analisada quanto à distribuição da fluorescência das células com peroxidação lipídica. O valor obtido é indicado no quadro como a média em unidades arbitrárias (u.a.).

partículas com o mesmo tamanho e granulosidade do espermatozoide. Em seguida, 0,5 µL da sonda Yo-Pro-1 foi adicionada a amostra (7,5 µM, cod. Y3603, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA), obtendo-se a concentração final de 25 nM. A membrana plasmática íntegra é impermeável ao Yo-Pro-1, e este se liga ao DNA das células com a membrana plasmática alterada. Então, a amostra foi incubada por 20 minutos (37°C) e, posteriormente, foi adicionado 0,5 µL da sonda fluorescente Merocianina 540 (810 µM; cod. 323756, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) a fim de se obter a concentração de 2,7 µM em uma solução final de 150 µL, em seguida incubada por 70 segundos.

Após esta etapa a amostra foi diluída em 150 µL de TALPm e analisadas por citometria de fluxo, na qual foi avaliada a porcentagem de espermatozoides viáveis (Yo-Pro-1 negativo) com aumento na desordem da bicamada lipídica (Merocianina 540 positivo). A Figura 18 apresenta um exemplo de gráfico de pontos gerados pelo *software* BD FACSDiva 6.0 após a contagem da amostra. A coloração com Merocianina 540 mostrou duas populações distintas de células viáveis (Yo-Pro-1 negativa), uma é caracterizada pelas células com emissão de baixa fluorescência e outra é caracterizada por alta (captado no *long pass*-595 e *band pass*-610/20). Os espermatozoides 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 18).

5.8.6 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (reprodutor como bloco), em arranjo de parcelas subdivididas, sendo o diluidor (4 diluidores) alocado na parcela e o tempo de equilíbrio na subparcela (3 tempos de equilíbrio), totalizando 12 tratamentos (4 diluidores x 3 tempos). As variáveis estudadas foram: características de motilidade espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, intensidade de peroxidação lipídica, e nível de desorganização da membrana (criocapacitação). Os resultados das médias e respectivos desvios padrão foram apresentados em tabelas.

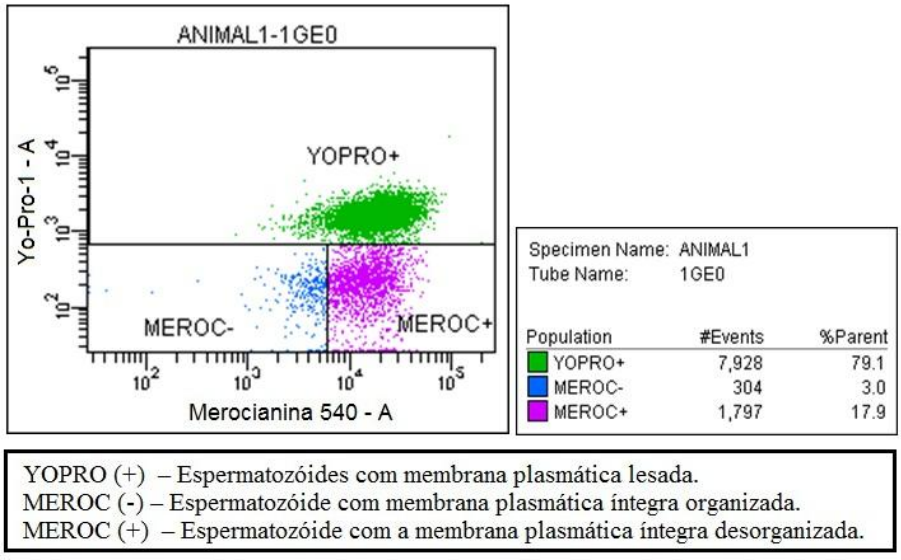


Figura 18 - Gráfico de pontos gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostra corada com a associação do H33342, Yo-Pro-1 e Merocianina 540 permitindo a classificação dos espermatozoides bovinos em três categorias.

Os dados foram analisados empregando-se o programa estatístico SAS (1998). Primeiramente foi verificada a normalidade dos dados, pelos testes de normalidade de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e de Assimetria e Curtose, por meio do procedimento UNIVARIATE com as opções NORMAL e PLOT do SAS (1998) e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett. A grande maioria das variáveis apresentou distribuição normal sem a necessidade de transformações. As variáveis dependentes que não atenderam as premissas estatísticas foram submetidas à transformações. As variáveis MOT (Motilidade Total), PROG (Motilidade Progressiva) e Rapid (Porcentagem de células rápidas) e AI (porcentagem de células com acrossomo intacto) foram submetidas à transformação angular (Arco-seno (X/100)) e a variável Hiper (porcentagem de células hiperativadas) foi submetida à transformação radicial ($\sqrt{(X+1/2)}$).

As variáveis que atenderam as premissas (com ou sem as transformações propostas) foram submetidas à análise de variância (PROC ANOVA) para verificar os efeitos do diluidor, tempo e do bloco e a interação entre tempo e diluidor. Para a comparação de médias foi utilizado o teste SNK (Student-Newman-Keuls), ao nível de significância de 5%. Além disso, foram estimadas correlações simples de Pearson entre algumas variáveis paramétricas.

Os dados que não apresentaram distribuição normal e homogeneidade das variâncias, mesmo após as tentativas de transformação (as variáveis Yo-Pro(+) (porcentagem de células positivas para Yo-Pro-1) e Meroc(-) (Porcentagem de células negativas para Yo-Pro-1 e negativas para Merocianina 540)) foram avaliados por intermédio de testes não-paramétricos. Nesse caso, o estudo do efeito das combinações de diluidor e tempo sobre as observações foi realizado pelo teste de Friedman, considerando o touro como bloco. Caso os resultados obtidos neste teste indicassem a existência de efeito significativo dos tratamentos sobre a característica, os contrastes de níveis de um fator dentro de um determinado nível do outro fator foram estudados utilizando o teste de Wilcoxon. Para estas análises, utilizou-se o software estatístico BioEstat 5.3 (Ayres et al., 2007). A tabela da análise de variância está representada a seguir (Tabela 4). O esquema experimental pode ser visualizado na figura a seguir (Figura 19). As fotos dos equipamentos e das etapas do experimento podem ser visualizadas no **Anexo 7**.

Tabela 4 - Análise de variância para delineamento com 4 Diluidores e 3 tempos de equilíbrio

Tabela ANOVA	
Fonte de Variação	gl.
Total 1 (Parcelas)	59
Diluidor	3
Touro (Bloco)	14
Erro (a)	42
Total 2 (Subparcelas)	179
Tempo	2
Diluidor x Tempo	6
Sub-blocos (parcelas)	59
Erro (b)	112

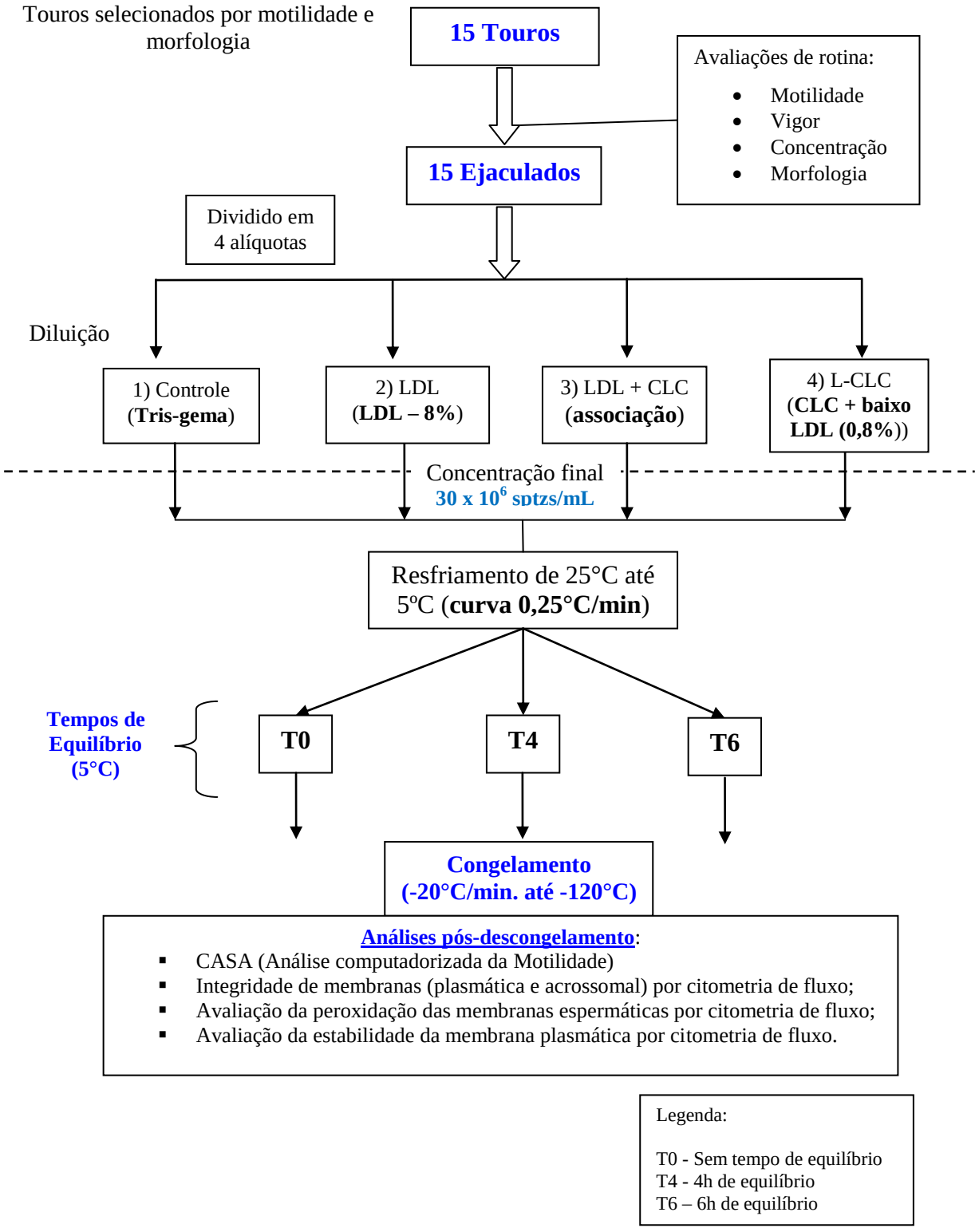


Figura 19 – Esquema Experimental

6 RESULTADOS:

6.1 Motilidade espermática pós-descongelamento avaliada pelo CASA

6.1.1 Motilidade Total (MOT)

Após o descongelamento, quanto à motilidade total das amostras de sêmen criopreservado, não houve efeito de interação entre tempo de equilíbrio e diluidor (P>0,05). Quanto ao efeito do tempo de equilíbrio, houve diferença significativa entre os três tempos utilizados, sendo que os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0) apresentaram os menores valores. Os tratamentos de 6 h de equilíbrio apresentaram os maiores valores de motilidade total (portanto: T6 > T4 > T0). Quanto ao efeito do diluidor, observaram-se diferenças entre os quatro diluidores, sendo que o diluidor LDL apresentou o maior valor, e o L-CLC o menor valor. Observou-se a seguinte ordem de classificação dos diluidores: LDL > $LDL^{+\ CLC}$ > Gema > L-CLC, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 - Médias ± desvios padrão da Motilidade Total (MOT, %) de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média por
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	**Diluidor**
MOT (%)	Gema	52,1 ± 13,3	70,1 ± 9,6	72,0 ± 10,1	$64,7 \pm 14,1^{C}$
	LDL	66,9 ± 12,0	80,9 ± 5,5	82,3 ± 6,1	$76,7 \pm 10,8^{A}$
	$LDL^{+\ CLC}$	62,1 ± 17,6	76,7 ± 10,1	79,4 ± 5,4	$72,7 \pm 14,1^{B}$
	L-CLC*	45,4 ± 13,8	58,1 ± 11,0	60,9 ± 10,3	$54,8 \pm 13,4^{D}$
Média por Tempo		$56,6 \pm 16,3^{c}$	$71,5 \pm 12,5^{b}$	$73,7 \pm 11,6^{a}$	

[aB] Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05). * L-CLC - diluidor com baixa concentração de LDL e inclusão de CLC.

6.1.2 Motilidade Progressiva (PROG)

Quanto à motilidade progressiva, não houve interação entre tempo de equilíbrio e diluidor (P>0,05). Em relação ao efeito do tempo de equilíbrio, os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0) apresentaram os menores valores. Os tratamentos com 4 e 6h não diferiram entre si, mas foram superiores a T0 (P<0,05). Quanto aos diluidores, o LDL e LDL^{+CLC} não diferiram entre si, porém apresentaram maiores valores do que os diluidores Gema e L-CLC, que também não diferiram entre si (Tabela 6).

Tabela 6 - Médias ± desvios padrão da Motilidade Progressiva (PROG, %) de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	**por Diluidor**
PROG (%)	Gema	39,7 ± 10,3	52,9 ± 8,6	54,6 ± 8,7	$49,1 \pm 11,2^{B}$
	LDL	50,9 ± 11,7	61,9 ± 6,8	62,7 ± 6,2	$58,5 \pm 10,0^{A}$
	$LDL^{+\ CLC}$	51,3 ± 15,0	63,1 ± 9,2	64,7 ± 6,0	$59,7 \pm 12,1^{A}$
	L-CLC	38,5 ± 12,4	47,6 ± 8,3	50,3 ± 8,1	$45,5 \pm 10,8^{B}$
Média por Tempo		$45,1 \pm 13,6^{b}$	$56,4 \pm 10,3^{a}$	$58,1 \pm 9,3^{a}$	

[aB] Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05).

6.1.3 Velocidade do trajeto (VAP)

Em relação à velocidade do trajeto (VAP), o único efeito significativo observado foi o de diluidor (P<0,05). O diluidor que apresentou o maior valor de VAP foi o LDL, seguido pelo L-CLC. Os diluidores Gema e a associação LDL^{+CLC} não diferiram entre si e apresentaram os menores valores, assim estabeleceu-se a seguinte ordem entre os diluidores: LDL > L-CLC > LDL^{+CLC} = Gema. Os valores das médias estão apresentados abaixo (Tabela 7).

Tabela 7 - Médias ± desvios padrão da velocidade do trajeto (VAP; µm/s), de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média por
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	**Diluidor**
VAP (µm/s)	Gema	87,6 ± 8,7	90,1 ± 7,7	88,9 ± 9,9	88,8 ± 8,6 ^{C}
	LDL	101,9 ± 11,4	104,8 ± 11,2	106,0 ± 11,3	104,2 ± 11,2 ^{A}
	LDL^{+CLC}	90,2 ± 9,4	90,0 ± 10,2	92,1 ± 12,3	90,8 ± 10,5 ^{C}
	L-CLC	97,9 ± 13,6	96,2 ± 11,7	97,3 ± 9,4	97,1 ± 11,5 ^{B}

^{A} Letras diferentes, maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05).

6.1.4 Velocidade progressiva (VSL)

Em relação à velocidade progressiva (VSL), os resultados apresentaram um padrão diferente das demais velocidades. O único efeito significativo observado foi o efeito de diluidor (P< 0,05), porém, apesar do efeito do tempo de equilíbrio não ser significativo, a interação entre diluidor e tempo de equilíbrio foi significativa (P<0,05). Dentro do tempo T0, o diluidor L-CLC foi o que apresentou os maiores valores e o diluidor Gema os menores de VSL. Em T0, os diluidores LDL e LDL^{+CLC} não diferiram entre si e apresentaram valores intermediários aos da Gema e do L-CLC. Nos tempo T4 e T6, o diluidor LDL apresentou valores de VSL superior aos valores do LDL^{+CLC}, porém não diferiu de L-CLC. O diluidor gema apresentou os menores valores em todos os tempos. Nos tempos T4 e T6 estabeleceu-se a seguinte ordem entre os diluidores: LDL = L-CLC > LDL^{+CLC} > Gema (Tabela 8).

Tabela 8 - Médias ± desvios padrão da velocidade progressiva (VSL; µm/s), de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média por
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	**Diluidor**
VSL (µm/s)	Gema	65,8 ± 5,5^{aC}	66,2 ± 4,8^{aC}	66,0 ± 6,4^{aC}	66 ± 5,5
	LDL	73,4 ± 6,0^{aB}	76,0 ± 6,7^{aA}	76,7 ± 6,7^{aA}	75,4 ± 6,5
	LDL^{+CLC}	70,2 ± 5,1^{aB}	69,4 ± 5,3^{aB}	71,1 ± 7,1^{aB}	70,2 ± 5,8
	L-CLC	78,7 ± 10,0^{aA}	75,2 ± 7,7^{aA}	76,5 ± 5,6^{aA}	76,8 ± 7,9

^{aB} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05).

6.1.5 Velocidade Curvilinear (VCL)

Em relação à velocidade curvilinear (VCL), houve efeito significativo apenas do diluidor (P < 0,05). O diluidor que apresentou o maior valor foi o LDL, seguido pelo L-CLC. Os diluidores Gema e $LDL^{+\ CLC}$ não diferiram entre si e apresentaram menores valores que os outros dois diluidores. Os valores das médias e desvios padrão estão apresentados abaixo (Tabela 9).

Tabela 9 - Médias ± desvios padrão da velocidade curvilinear (VCL; μm/s), de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média por
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	**Diluidor**
VCL (μm/s)	Gema	150,9 ± 15,5	156,8 ± 13,0	154,8 ± 16,7	$154,1 \pm 15,0^{C}$
	LDL	183,6 ± 21,8	188,7 ± 21,5	191,1 ± 18,8	$187,8 \pm 20,5^{A}$
	$LDL^{+\ CLC}$	159,8 ± 19,4	160,2 ± 20,3	161,7 ± 23,3	$160,6 \pm 20,6^{C}$
	L-CLC	177,5 ± 24,5	177,6 ± 22,4	177,2 ± 19,4	$177,4 \pm 21,7^{B}$

[A] Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05).

6.1.6 Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH)

No processo de criopreservação, em relação à amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, *μm*), houve efeitos significativos (P<0,05) do tempo de equilíbrio e do diluidor, porém, não houve interação entre estes dois fatores (P>0,05). Em relação ao tempo de equilíbrio, não houve diferença (P>0,05) entre T4 e T6, porém observou-se um aumento do ALH nestes tempos, em relação aos tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0). Em relação aos diluidores, LDL e L-CLC apresentaram os maiores valores, e não diferiram entre si (LDL = L-CLC), e os diluidores Gema e LDL^{+CLC} apresentaram os menores valores, que não diferiram entre si (Gema = LDL^{+CLC}) (Tabela 10).

Tabela 10 - Médias ± desvios padrão da amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH; μm) de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média por
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	**Diluidor**
ALH (μm)	Gema	6,7 ± 0,6	7,1 ± 0,5	7,0 ± 0,6	$7,0 \pm 0,6^{B}$
	LDL	7,5 ± 0,8	7,9 ± 0,8	8,0 ± 0,7	$7,8 \pm 0,8^{A}$
	$LDL^{+\ CLC}$	6,8 ± 0,8	7,0 ± 0,8	6,9 ± 0,8	$6,9 \pm 0,8^{B}$
	L-CLC	7,3 ± 0,9	7,5 ± 0,8	7,5 ± 0,8	$7,4 \pm 0,8^{A}$
Média por Tempo		$7,1 \pm 0,8^{b}$	$7,4 \pm 0,8^{a}$	$7,4 \pm 0,8^{a}$	

[aB] Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05).

6.1.7 Frequência de Batimentos Flagelares (BCF)

Em relação à frequência de batimentos flagelares (BCF, Hz), houve efeitos significativos de tempo de equilíbrio, diluidor e da interação entre estes efeitos (P<0,05). Quando observamos dentro de todos os tempos de equilíbrio (T0-T6), o diluidor que apresentou os maiores valores de BCF foi o L-CLC, e o diluidor que apresentou os menores valores foi o Gema, e os demais apresentaram valores intermediário, assim estabeleceu-se a seguinte ordem: L-CLC > LDL^{+CLC} > LDL > Gema, para todos os tempos. Quando observamos dentro de diluidor, para o diluidor Gema, não houve efeito do tempo de equilíbrio em relação a BCF. Para os demais diluidores, observou-se que nos tempos T4 e T6 houve uma redução do BCF, em relação ao tempo T0. Para o LDL^{+CLC} o valor de T4 não diferiu de T0 e T6 (Tabela 11).

Tabela 11 - Médias ± desvios padrão da frequência de batimentos flagelares (BCF; Hz), de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média por
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	**Diluidor**
BCF (Hz)	Gema	$20,1 \pm 2,4^{aD}$	$20,1 \pm 1,8^{aD}$	$20,4 \pm 1.8^{aD}$	20,2 ± 2,0
	LDL	$23,3 \pm 2,4^{aC}$	$22,0 \pm 1,9^{bC}$	$21,8 \pm 2,3^{bC}$	22,4 ± 2,3
	LDL^{+CLC}	$24,8 \pm 1,9^{aB}$	$24,0 \pm 2,4^{abB}$	$23,3 \pm 2,6^{bB}$	24,0 ± 2,4
	L-CLC	$29,2 \pm 2,6^{aA}$	$27,4 \pm 2,6^{bA}$	$27,5 \pm 2,5^{bA}$	28,0 ± 2,6

^{aB} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05).

6.1.8 Retilinearidade (STR)

Em relação à retilinearidade (STR; %*)* do movimento dos espermatozoides, observaram-se efeitos significativos (P<0,05) de tempo de equilíbrio e do diluidor, e não houve interação entre estes fatores (P>0,05). Quanto ao tempo de equilíbrio, observou-se uma redução da retilinearidade nos tratamento T4 e T6 em relação ao controle (T0), porém não houve diferença entre T4 e T6. Quanto aos diluidores, o L-CLC apresentou o maior valor, e não diferiu de LDL^{+CLC}. O diluidor LDL apresentou o menor valor de STR. Assim temos: L-CLC = LDL^{+CLC} > Gema > LDL (Tabela 12).

Tabela 12 - Médias ± desvios padrão da retilinearidade (STR; %), do movimento de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média por
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	**Diluidor**
STR (%)	Gema	77,1 ± 2,4	74,9 ± 2,7	75,5 ± 3,7	$75,8 \pm 3,0^{B}$
	LDL	74,4 ± 4,4	73,9 ± 4,0	73,6 ± 3,3	$74,0 \pm 3,8^{C}$
	LDL^{+CLC}	79,7 ± 3,8	78,7 ± 4,1	78,5 ± 4,3	$79,0 \pm 4,0^{A}$
	L-CLC	81,4 ± 2,8	79,1 ± 3,8	79,4 ± 3,5	$80,0 \pm 3,5^{A}$
Média por Tempo		$78,2 \pm 4,3^{a}$	$76,7 \pm 4,2^{b}$	$76,8 \pm 4,3^{b}$	

^{aB} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05).

6.1.9 Linearidade (LIN)

Em relação à linearidade (LIN; %) do movimento dos espermatozoides, observaram-se efeitos significativos (P<0,05) de tempo de equilíbrio e do diluidor, porém, não houve interação entre estes fatores (P>0,05). Quanto ao tempo de equilíbrio, observou-se uma redução da linearidade nos tratamentos T4 e T6 em relação ao controle (T0), porém estes não diferiram entre si. Quanto aos diluidores, o diluidor LDL apresentou os menores valores de LIN, diferindo dos demais diluidores, porém não houve diferenças entre os diluidores Gema, LDL^{+CLC} e L-CLC. Assim temos: Gema = LDL^{+CLC} = L-CLC > LDL (Tabela 13).

Tabela 13 - Médias ± desvios padrão da linearidade (LIN; %) do movimento de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média por Diluidor
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	
LIN (%)	Gema	46,7 ± 1,9	44,3 ± 2,1	45,0 ± 2,5	$45,4 \pm 2,4^{A}$
	LDL	42,9 ± 3,2	42,6 ± 3,0	42,1 ± 2,3	$42,6 \pm 2,8^{B}$
	LDL^{+CLC}	47,2 ± 3,9	46,4 ± 3,8	46,5 ± 3,8	$46,7 \pm 3,8^{A}$
	L-CLC	47,2 ± 3,2	44,9 ± 3,5	45,7 ± 3,6	$45,9 \pm 3,5^{A}$
Média por Tempo		$46,0 \pm 3,6^{a}$	$44,6 \pm 3,4^{b}$	$44,8 \pm 3,5^{b}$	

^{aB} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05).

6.1.10 Porcentagem de células rápidas (Rapid)

Em relação à porcentagem de células rápidas (Rapid; %) no sêmen criopreservado, observaram-se efeitos significativos (P<0,05) de tempo de equilíbrio e do diluidor, e não houve interação entre estes fatores (P>0,05). Quanto ao tempo de equilíbrio, observaram-se diferenças (P<0,05) entre os três tempos, sendo que T6 apresentou os maiores valores, e o T0 os menores (T6 > T4 > T0). Quanto aos diluidores, houve diferença significativa entre os quatro diluidores, sendo que o diluidor LDL apresentou os maiores valores, e o L-CLC os menores. Assim temos: LDL > LDL^{+CLC} > Gema > L-CLC (Tabela 14).

Tabela 14 - Médias ± desvios padrão da porcentagem de células rápidas (Rapid; %) de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média por Diluidor
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	
Rapid (%)	Gema	48,5 ± 12,5	66,5 ± 9,7	68,1 ± 10,5	$61,0 \pm 14,0^{C}$
	LDL	64,5 ± 12,0	79,0 ± 5,4	80,7 ± 6,2	$74,7 \pm 11,0^{A}$
	LDL^{+CLC}	59,9 ± 17,3	74,0 ± 10,4	76,8 ± 5,9	$70,2 \pm 14,0^{B}$
	L-CLC	43,8 ± 14,0	55,8 ± 11,2	58,8 ± 10,8	$52,8 \pm 13,5^{D}$
Média por Tempo		$54,2 \pm 16,1^{c}$	$68,8 \pm 12,7^{b}$	$71,1 \pm 12,0^{a}$	

^{aB} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05).

6.1.11 Porcentagem de células hiperativas (Hiper)

Em relação à porcentagem de células hiperativas (Hiper; %) no sêmen criopreservado, observaram-se efeitos isolados e significativos (P<0,05) de tempo de equilíbrio e do diluidor e não houve interação entre estes fatores (P>0,05). Quanto ao tempo de equilíbrio, observou-se diferença pequena, porém significativa (P<0,05) entre os tempos de equilíbrio (T4 e T6) e o controle (T0). Os tratamentos T4 e T6 apresentaram maior porcentagem de células hiperativas que T0, porém não houve diferença entre T4 e T6, ou seja: T6 = T4 > T0. Quanto aos diluidores, o diluidor LDL apresentou o maior valor de Hiper, diferindo dos demais diluidores (diferença de aprox. 10 %), porém não houve diferenças entre os diluidores Gema, LDL^{+CLC} e L-CLC. Assim temos: LDL > Gema = LDL^{+CLC} = L-CLC (Tabela 15).

Tabela 15 - Médias ± desvios padrão da porcentagem de células hiperativas (Hiper, %) de espermatozoides bovinos criopreservados utilizando quatro diluidores e três tempos de equilibrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média por
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	**Diluidor**
Hiper (%)	Gema	13,3 ± 4,5	15,0 ± 4,4	14,0 ± 5,1	$14,1 \pm 4,6^{B}$
	LDL	22,3 ± 7,9	24,1 ± 8,5	25,0 ± 6,2	$23,8 \pm 7,5^{A}$
	LDL^{+CLC}	13,7 ± 5,5	13,8 ± 6,6	13,4 ± 7,2	$13,6 \pm 6,3^{B}$
	CLC	12,3 ± 5,1	14,5 ± 6,4	14,5 ± 6,5	$13,8 \pm 6,0^{B}$
Média por Tempo		$15,4 \pm 7,0^{b}$	$16,9 \pm 7,7^{a}$	$16,7 \pm 7,8^{a}$	

^{aB} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05).

6.2 Análises por citometria de fluxo

6.2.1 Porcentagem de células com Membranas Plasmática e Acrossomal Intactas (AIMPI)

Após o descongelamento das amostras, avaliadas pela associação das sondas H33342, PI e FITC-PSA, observou-se interação entre os efeitos de tempo de equilíbrio e diluidor (P<0,05) sobre a porcentagem de espermatozoides com acrossoma intacto e membrana plasmática intacta (AIMPI). Quando observado dentro de diluidor, os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0, controle) apresentaram os menores valores de AIMPI diferindo-se de 4h (T4) e 6h (T6), para todos os diluidores (P<0,05). Nos tratamentos com os diluidores Gema e LDL observou-se o mesmo padrão, ou seja, para estes diluidores houve diferenças significativas entre os três tempos, sendo que no tempo de 6h estes diluidores apresentaram os maiores valores (T6 > T4 > T0). Para os diluidores LDL^{+CLC} e L-CLC não houve diferença significativa (P>0,05) entre os tempos de equilíbrio de 4 (T4) e 6 (T6) horas, porém estes (T4 e T6) diferiram do tratamento controle (T0) (P<0,05) (ou seja, T4=T6 > T0).

Dentro do tratamento controle (T0), o diluidor LDL apresentou os maiores valores de AIMPI, e não houve diferença significativa entre os demais diluidores. No tempo T4, os diluidores LDL e LDL^{+CLC} não diferiram, porém apresentaram maiores valores de AIMPI em relação aos diluidores Gema e L-CLC, que também não diferiram entre si (LDL = LDL^{+CLC} > Gema = L-CLC). No tempo de 6 h de equilíbrio o diluidor

LDL apresentou os maiores valores, seguido pelos diluidores Gema e LDL^{+CLC}, que não diferiram entre si, porém apresentaram maiores valores em relação ao diluidor L-CLC, que apresentou os menores valores de AIMPI. (em T6, LDL > Gema = LDL^{+CLC} > L-CLC). Em geral, para todos os tempos de equilíbrio, o diluidor LDL foi o que melhor preservou a integridade das duas membranas. O tratamento LDL com 6h de equilíbrio apresentou a maior porcentagem de células AIMPI (o resultado mais desejável) (Tabela 16; Figura 20).

Tabela 16 - Médias ± desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal intactas (AIMPI, %), em sêmen bovino criopreservado utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

Variável	Diluidor	Tempo de Equilíbrio			Média por Diluidor
		T0	T4	T6	
AIMPI (%)	Gema	18,6 ± 6,9^{cB}	31,4 ± 6,5^{bB}	35,6 ± 6,2^{aB}	28,5 ± 9,7
	LDL	25,5 ± 5,5^{cA}	39,4 ± 7,6^{bA}	**43,7 ± 10,6^{aA}**	36,2 ± 11,2
	LDL^{+CLC}	21,2 ± 6,4^{bB}	38,2 ± 8,2^{aA}	38,0 ± 9,9^{aB}	32,4 ± 11,4
	L-CLC	18,9 ± 7,9^{bB}	28,5 ± 8,2^{aB}	30,9 ± 8,0^{aC}	26,1 ± 9,4
Média por Tempo		21,1 ± 7,1	34,4 ± 8,8	37,0 ± 9,8	

^{aB} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05).

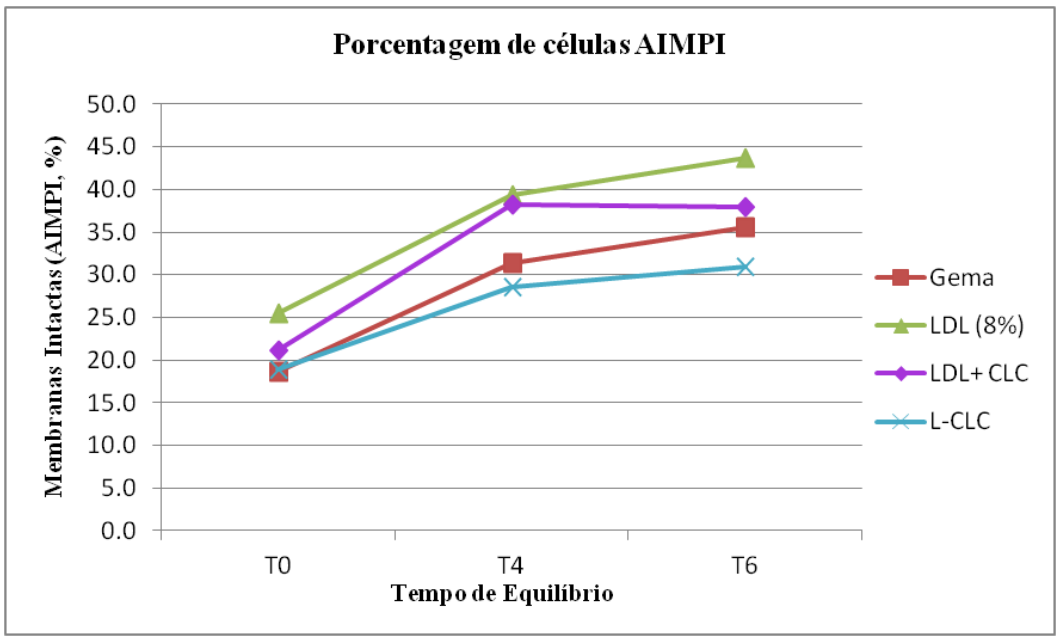


Figura 20 – Gráfico da porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal intactas (AIMPI), em função do tempo de equilíbrio. É possível verificar uma estabilização dos diluidores com CLC a partir de 4h de equilíbrio.

6.2.2 Porcentagem de células com Membrana Plasmática Intacta (MPI)

Em relação à porcentagem de células com membrana plasmática intacta (MPI), observou-se o mesmo padrão da AIMPI e valores muito próximos. Observou-se uma correlação alta (r = 0,9996) e positiva entre estes valores, indicando que a quase totalidade das células que apresentaram membrana plasmática intacta, também apresentam acrossomo intacto (Tabela 17). Portanto, a população de células que apresentavam a membrana plasmática intacta e acrossomo reagido (ou lesado) foi muito pequena.

Tabela 17 - Médias ± desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta (MPI, %), em sêmen bovino criopreservado utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média por
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	**Diluidor**
MPI (%)	Gema	$18,8 \pm 6,9^{cB}$	$31,8 \pm 6,6^{bB}$	$36,0 \pm 6,3^{aB}$	$28,9 \pm 9,8$
	LDL	$25,7 \pm 5,5^{cA}$	$39,6 \pm 7,7^{bA}$	$43,8 \pm 10,6^{aA}$	$36,4 \pm 11,2$
	LDL^{+CLC}	$21,2 \pm 6,4^{bB}$	$38,3 \pm 8,3^{aA}$	$38,1 \pm 9,9^{aB}$	$32,6 \pm 11,5$
	L-CLC	$19,1 \pm 7,9^{bB}$	$28,8 \pm 8,3^{aB}$	$31,4 \pm 8,1^{aC}$	$26,4 \pm 9,6$
Média por Tempo		$21,2 \pm 7,1$	$34,6 \pm 8,8$	$37,3 \pm 9,8$	

^{aB} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05).

6.2.3 Porcentagem de células com Membrana Acrossomal Intactas (AI)

Em relação à porcentagem de células com membrana acrossomal intacta (AI, %), observaram-se efeitos significativos (P<0,05) de tempo de equilíbrio e do diluidor, porém, não houve interação entre estes fatores (P>0,05). Os tempos de equilíbrio T4 e T6 apresentaram maiores valores de AI do que o controle (T0), porém não houve diferença (P>0,05) entre os tratamentos T4 e T6 (T4 = T6). Quanto ao diluidor, observou-se que o tratamento com LDL^{+CLC} apresentou os maiores valores numéricos de AI, porém diferiu estatisticamente apenas de L-CLC (com os menores valores de AI). Gema e LDL não diferiram entre si, e nem diferiram dos demais diluidores (LDL^{+CLC} e L-CLC) (Tabela 18). Observou-se uma correlação alta e positiva (r = 0.81) entre AI e AIMPI.

Tabela 18 - Médias ± desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal intacta (AI, %), em sêmen bovino criopreservado utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média por
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	**Diluidor**
AI (%)	Gema	$50,5 \pm 11,2$	$65,6 \pm 6,2$	$68,4 \pm 6,7$	$61,5 \pm 11,4^{AB}$
	LDL	$50,5 \pm 10,4$	$66,4 \pm 8,6$	$68,7 \pm 9,1$	$61,8 \pm 12,3^{AB}$
	LDL^{+CLC}	$53,5 \pm 10,7$	$69,4 \pm 8,0$	$69,3 \pm 8,1$	$64,1 \pm 11,6^{A}$
	L-CLC	$49,4 \pm 12,5$	$63,4 \pm 9,2$	$63,2 \pm 10,6$	$58,7 \pm 12,6^{B}$
Média por Tempo		$51,0 \pm 11,0^{b}$	$66,2 \pm 8,1^{a}$	$67,4 \pm 9,0^{a}$	

^{aB} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença pelo teste SNK (P<0,05).

6.2.4 Peroxidação das membranas espermáticas (Perox MPI)

Em relação à intensidade da peroxidação lipídica, o único efeito significativo (P < 0,05) foi o de diluidor. Observou-se pela intensidade de fluorescência, que o diluidor L-CLC apresentou maior peroxidação das membranas dos espermatozoides viáveis (MPI) do que os outros diluidores. Os tratamentos com LDL e LDL^{+CLC} não diferiram entre si, porém apresentaram maior peroxidação das membranas do que os tratamentos que utilizaram os diluidores a base de Gema (Assim: L-CLC > LDL^{+CLC} = LDL > Gema) (Tabela 19).

Tabela 19 - Médias ± desvios padrão dos valores lineares médios da intensidade de fluorescência da população espermática com membrana plasmática íntegra (MPI) e coradas com a sonda C11-$BODIPY^{581/591}$ (Perox_MPI) em sêmen bovino criopreservado utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média por
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	**Diluidor**
Perox MPI	Gema	110,7 ± 71,7	111,1 ± 62,8	130,8 ± 61,2	$117,6 \pm 64,6^{C}$
(u.a.)*	LDL	132,3 ± 40,9	132,3 ± 40,9	153,7 ± 46,1	$139,4 \pm 45,6^{B}$
	LDL^{+CLC}	139,7 ± 65,2	142,0 ± 57,0	157,6 ± 54,4	$146,4 \pm 58,2^{B}$
	L-CLC	184,8 ± 76,0	205,2 ± 83,5	195,9 ± 65,5	$195,3 \pm 74,1^{A}$
Média por Tempo		141,8 ± 70,0	147,7 ± 70,8	159,5 ± 60,6	

[A] Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05).
* Os valores estão representados em unidades arbitrárias (u.a.).

6.2.5 Estabilidade da membrana plasmática

A associação das sondas H33342, Yo-Pro-1 e Merocianina 540 ao ser analisada pela citometria de fluxo deu origem a três subpopulações distintas: 1) células coradas com o Yo-Pro-1, (células com membrana plasmática alterada ou lesada e consideradas inviáveis, Yo-Pro-(+)); 2)células não coradas com o Yo-Pro-1 (–), com baixo sinal de fluorescência para a Merocianina 540 (células não capacitadas, com a membrana plasmática íntegra e consideradas viáveis, Meroc (–)); e 3) células com alto sinal de fluorescência para a Merocianina 540, mas com baixo sinal de fluorescência para o Yo-Pro-1 (células viáveis e consideradas capacitadas, já que possuem uma alta desorganização de sua bicamada lipídica, quadrante Meroc (+)).

6.2.5.1 Porcentagem de células com membrana plasmática alterada (Yo-Pro (+))

Em relação à porcentagem de células Yo-Pro-(+) (membrana alterada), esta variável não apresentou um comportamento que permitisse a utilização de testes paramétricos, mesmo após transformação da variável, portanto, foi necessária a utilização de testes não paramétricos. Observaram-se efeitos significativos (P<0,05) de tempo de equilíbrio e do diluidor.

Quando observamos dentro de cada diluidor, os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0, controle) apresentaram os maiores valores de Yo-Pro(+) diferindo-se de T4 e T6 para a maioria dos diluidores, porém não houve diferença entre os tempos para o diluidor L-CLC. Para os diluidores Gema e LDL não houve diferença entre os tempos T4 e T6. Apenas para o diluidor LDL^{+CLC} houve diferença entre os três tempos, sendo que T6

apresentou os menores valores de Yo-Pro-(+).

Quando observamos dentro de cada tempo, o diluidor L-CLC apresentou os maiores valores em todos os tempos, diferindo dos demais diluidores. Os diluidores Gema, LDL e LDL^{+CLC} não diferiram entre si (Gema = LDL = LDL^{+CLC}), dentro de cada um dos tempos de equilíbrio utilizados.

Tabela 20 - Médias ± desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática alterada corados com YO-PRO-1 (Yo-Pro +, %), em sêmen bovino criopreservado utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

		Tempo de Equilíbrio			Média por
Variável	**Diluidor**	**T0**	**T4**	**T6**	**Diluidor**
Yo-Pro + (%)	Gema	$81,4 \pm 7,2^{aB}$	$68,7 \pm 7,4^{bB}$	$66,0 \pm 7,5^{bB}$	$72,0 \pm 9,9$
	LDL	$77,4 \pm 8,3^{aB}$	$64,4 \pm 9,9^{bB}$	$60,3 \pm 11,5^{bB}$	$67,4 \pm 12,2$
	LDL^{+CLC}	$81,0 \pm 8,3^{aB}$	$65,6 \pm 11,9^{bB}$	$61,1 \pm 11,3^{cB}$	$69,3 \pm 13,5$
	L-CLC	$97,6 \pm 1,6^{aA}$	$97,5 \pm 1,0^{aA}$	$97,3 \pm 1,5^{aA}$	$97,5 \pm 1,4$
Média por Tempo		$84,3 \pm 10,4$	$74,1 \pm 16,1$	$71,2 \pm 17,6$	

^{aB} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa pelo teste não paramétrico de Wilcoxon (P<0,05).

6.2.5.2 Porcentagem de células viáveis com membrana plasmática estável (não capacitadas) (Meroc (-))

Em relação à porcentagem de células Meroc (-) (células viáveis não capacitadas), esta variável não apresentou um comportamento que permitisse a utilização de testes paramétricos, portanto, foi necessária a utilização de testes não paramétricos. Observaram-se efeitos significativos (P<0,05) de tempo de equilíbrio e do diluidor.

Quando observamos dentro de cada diluidor, os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0, controle) apresentaram os menores valores de Meroc (-) diferindo-se de T4 e T6 para a maioria dos diluidores, porém não houve diferença entre os tempos T0 e T4 para o diluidor L-CLC, porém T6 diferiu dos demais tempos para este diluidor. Para os diluidores Gema, LDL e LDL^{+CLC} não houve diferença entre os tempos T4 e T6.

Quando observamos dentro de cada tempo, os diluidores LDL e LDL^{+CLC} não diferiram entre si e apresentaram as maiores porcentagens de células viáveis não capacitadas (Meroc -) em todos os tempos, porém em T0 o diluidor LDL^{+CLC} não diferiu de Gema. Nos tempos T4 e T6 a Gema apresentou menores valores que os diluidores a base de LDL (LDL e LDL^{+CLC}), porém apresentou maiores valores que o L-CLC. Em todos os tempos o diluidor L-CLC apresentou os menores valores de células Meroc (-) (Tabela 21; Figuras 21 e 22).

Tabela 21 - Médias ± desvios padrão da porcentagem de células viáveis não capacitadas, negativas para Merocianina 540 (Meroc (–), %), em sêmen bovino criopreservado utilizando quatro diluidores e três tempos de equilíbrio.

Variável	Diluidor	Tempo de Equilíbrio			Média por Diluidor
		T0	T4	T6	
Meroc (–) (%)	Gema	$4,9 \pm 2,5^{bB}$	$8,9 \pm 3,3^{aB}$	$9,5 \pm 4,5^{aB}$	$7,7 \pm 4,0$
	LDL	$7,8 \pm 2,6^{bA}$	$13,6 \pm 4,9^{aA}$	$14,5 \pm 3,9^{aA}$	$12,0 \pm 4,9$
	LDL^{+CLC}	$6,9 \pm 2,9^{bAB}$	$12,3 \pm 3,7^{aA}$	$14,7 \pm 2,8^{aA}$	$11,3 \pm 4,5$
	L-CLC	$1,0 \pm 1,2^{bC}$	$1,1 \pm 0,7^{bC}$	$1,3 \pm 0,8^{aC}$	$1,1 \pm 0,9$
Média por Tempo		$5,1 \pm 3,5$	$9,0 \pm 6,0$	$10,0 \pm 6,4$	

[aB] Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa pelo teste não paramétrico de Wilcoxon (P<0,05).

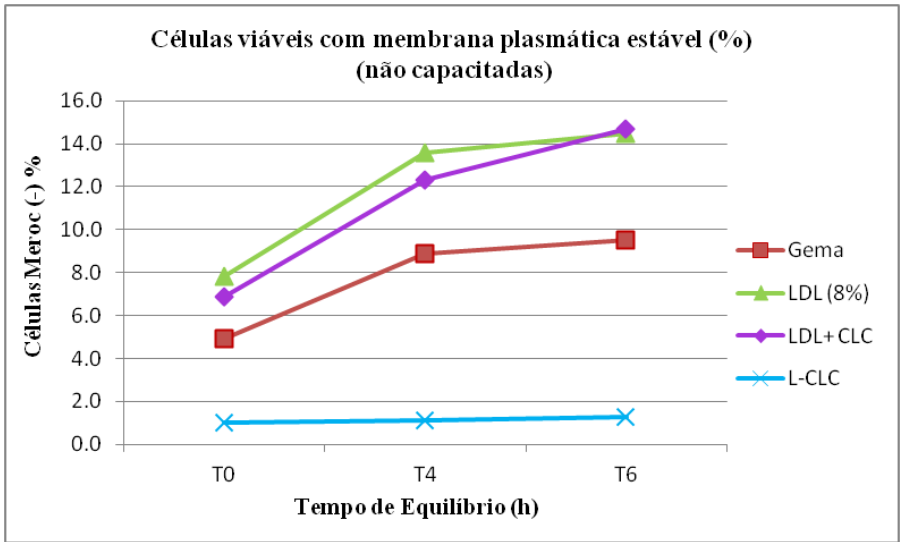


Figura 21 – Gráfico da porcentagem de células viáveis com membranas plasmática estável (Meroc (-)), em função do tempo de equilíbrio.

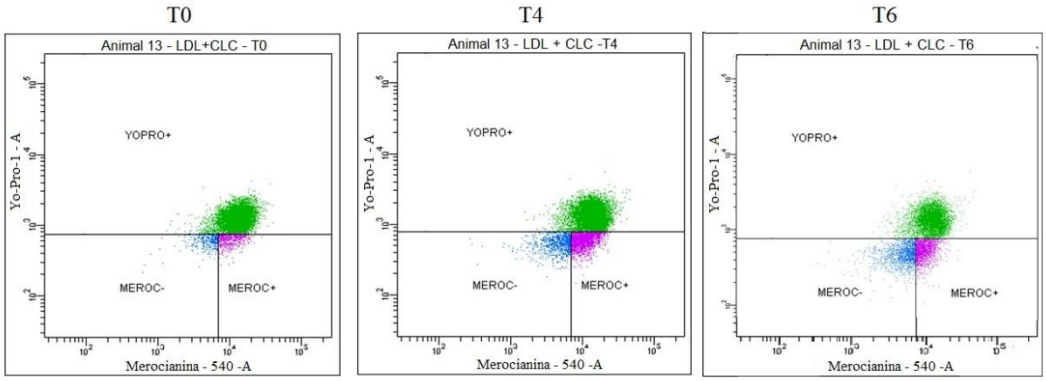


Figura 22 - Gráfico de pontos gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostras coradas com a associação do H33342, Yo-Pro-1 e Merocianina 540. Comparando os gráficos dos três tempos para o diluidor LDL^{+CLC} é possível visualizar que nos tempos T4 e T6 ocorre um aumento significativo das populações Meroc (-) e redução da população Yo-Pro (+).

7 DISCUSSÃO

Na literatura, até recentemente, não existia um consenso quanto à necessidade e duração do equilíbrio na criopreservação de sêmen e seus efeitos sobre a viabilidade espermática (Gao et al., 1997; Leite et al., 2010). Vários estudos (Dhami et al., 1992; Dhami e Sahni, 1993; Foote e Kaproth, 2002; Muiño et al., 2007; Leite et al., 2010) ainda questionavam a necessidade de realizar o tempo de equilíbrio e seu benefício real para viabilidade espermática. Além disso, a duração mínima do tempo de equilíbrio necessário para se ter bons resultados na criopreservação do sêmen permanecia controversa (Dhami et al., 1992; Dhami e Sahni, 1993; Leite et al., 2010).

Porém, ainda existe o desejo de se reduzir ou eliminar essa etapa, acelerando assim o processo de criopreservação, contanto que isto não comprometa a qualidade pós-descongelamento dos espermatozoides (Dhami et al., 1992;. Dhami e Sahni, 1993; Leite et al., 2010).

Até recentemente, existiam dúvidas a respeito do efeito do tempo de equilíbrio sobre a motilidade espermática e a integridade das membranas. Leite et al. (2010), utilizando métodos de congelamento automatizado e métodos de análise de sêmen objetivos e precisos (CASA e citometria de fluxo), concluíram que o tempo de equilíbrio é necessário para preservar melhor a motilidade e a integridade das membranas dos espermatozoides, e que 4 h de equilíbrio resultou na maior sobrevivência espermática, independente do diluidor utilizado. Este resultado coincide com o que é empregado pelas centrais de IA (4h de equilíbrio).

Um grande problema na comparação entre trabalhos que utilizam o tempo de equilíbrio é a própria definição do tempo de equilíbrio. Alguns autores consideram que os processos de resfriamento e o tempo de equilíbrio não são necessariamente etapas independentes do processo de criopreservação e por isso podem ser consideradas como uma única etapa (Salamon e Maxwell, 1995a).

Outros trabalhos consideram o tempo de equilíbrio como o tempo de exposição aos diluidores que contém glicerol, ou seja, o tempo de exposição e equilíbrio do glicerol, porém os trabalhos de Berndtson e Foote (1969, 1972a,b) demonstraram que esta definição é errônea, visto que o glicerol penetra o espermatozoide bovino rapidamente (5 min.).

Leite et al. (2010) adotaram a definição do tempo de equilíbrio como o tempo de exposição do sêmen diluído e resfriado à temperatura de 5°C (ou seja, a partir do momento que o sêmen atinge essa temperatura). A mesma definição foi utilizada no presente experimento.

Atualmente existe uma demanda crescente para a substituição da gema de ovo nos diluidores de sêmen devido ao risco sanitário envolvido e devido à descoberta de substâncias prejudiciais presentes na gema. Além disso, estudos demonstram que a utilização das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) purificadas como substituto da gema pode ser uma excelente alternativa para a preparação de meios quimicamente definidos, apresentando vantagens em relação à qualidade e fertilidade do sêmen criopreservado (Moussa et al., 2002; Amirat et al., 2004; Amirat et al., 2005).

Contudo, não existem estudos da associação das CLC e da LDL na preparação de meios diluidores, e sobre suas possíveis interações com outros fatores da criopreservação. Portanto, o objetivo principal deste estudo foi avaliar o efeito de diluidores contendo a associação de colesterol (CLC) e LDL na criopreservação do sêmen bovino e testar a

hipótese de que estes diluidores necessitam de um menor tempo de equilíbrio para preservar a motilidade e a integridade das membranas espermáticas pós-descongelamento em relação à diluidores que contém apenas uma dessas substâncias.

7.1 Análise computadorizada da motilidade espermática

Neste experimento observou-se que os tratamentos que utilizaram tempo de equilíbrio (4 e 6 h) apresentaram maior motilidade total e progressiva ($P<0,05$) que os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0), porém houve diferença entre 4 e 6h apenas para a motilidade total. A diferença entre T6 e T0 foi de 17,1% para MOT e de 13% para PROG, o que representa um incremento percentual de 30% e 28,8%, respectivamente. Estes resultados demonstram a necessidade da realização do tempo de equilíbrio para preservar a motilidade espermática, independente do diluidor utilizado.

Estes resultados condizem com vários outros estudos (Graham et al., 1957; Pickett e Berndtson, 1978; Berndtson e Foote, 1969, 1972a,b; Dhami et al., 1992; Dhami e Sahni, 1993; Foote e Kaproth, 2002) que demonstraram que o tempo de equilíbrio é importante para a manutenção da motilidade espermática. Os resultados do atual experimento confirmam os resultados de Leite et al. (2010), que encontraram que 4 h de equilíbrio resulta em maior motilidade do que o tratamento sem tempo de equilíbrio.

Utilizando os diluidores Tris-gema e leite integral-gema-glicerol, Dhami et al. (1992), e Dhami e Sahni (1993) relataram que o resfriamento lento e pelo menos 2 h de equilíbrio a 5°C melhoraram a motilidade pós-descongelamento (44 vs. 35,5%) e a fertilidade (57,9 vs. 47.2%, taxa de não-retorno aos 90 dias) em comparação com o tratamento sem tempo de equilíbrio. Além disso, os autores especularam que melhores resultados poderiam ser obtidos se maiores tempos de equilíbrio fossem utilizados. Os resultados obtidos no presente experimento corroboram com estas afirmações.

Na maioria dos estudos que abordam o tempo de equilíbrio, a motilidade pós-descongelamento (avaliada subjetivamente) é o único método de avaliação da sobrevivência espermática (Berndtson e Foote, 1969; Pickett e Berndtson, 1978). Entretanto, a análise visual por microscopia não é um método preciso, não é capaz de prever a fertilidade com precisão, e produz apenas avaliações superficiais de morfologia e motilidade dos espermatozoides, enquanto que a fertilização envolve vários eventos morfológicos e bioquímicos complexos (Verstegen et al., 2002; Arruda et al., 2007; Leite et al., 2010).

Vários pesquisadores utilizaram avaliações subjetivas do sêmen na tentativa de estabelecer a duração ótima do tempo de equilíbrio. Entretanto, existem relatos conflitantes em relação à sobrevivência e fertilidade do sêmen bovino criopreservado (Foote and Kaproth, 2002), especialmente quando se trabalhou com diferentes diluidores, métodos de envase, e taxas de resfriamento e congelamento diferentes (Graham et al., 1957). Por exemplo, Miller e Vandermark (1954) compararam 2, 6 e 18 h de equilíbrio utilizando citrato-gema e encontraram que 6h foi suficiente para se obter uma sobrevivência espermática aceitável. Entretanto, O'Dell e Hurst (1956), utilizando citrato-gema e leite desnatado, relataram maior recuperação espermática para 0 h em comparação com 18 h.

A motilidade espermática é uma das características mais importantes associadas com a capacidade fertilizante do sêmen, e há muito tempo é reconhecida como essencial para o transporte espermático no trato reprodutivo feminino e para a fertilização (Januskauskas et al., 1999; Celeghini, 2005). Entretanto, a avaliação subjetiva da

motilidade, que é o parâmetro mais utilizado para determinar a qualidade do sêmen bovino, já foi relatada tanto como fortemente correlacionada como fracamente correlacionada à fertilidade (Tartagliore e Ritta, 2004). Este método é rápido e barato, porém é subjetivo e impreciso. Uma avaliação mais objetiva e precisa de motilidade espermática pode ser obtida utilizando-se um sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA) (Christensen et al., 2005). A análise computadorizada fornece cálculos mais precisos da velocidade e da trajetória de cada célula espermática, e algumas das variáveis do CASA têm sido correlacionados com a fertilidade (MOT, r = 0,58) sendo que combinações de mais variáveis (2 a 5) do CASA apresentaram correlações mais altas (r = 0,82-0,99) com a fertilidade, quando foram utilizadas equações de regressão múltipla (Farrel et al., 1998).

Comparando os resultados do presente estudo com os dados de Leite et al. (2010), observa-se que no presente estudo não houve interação entre os efeitos do tempo de equilíbrio e do diluidor para as motilidade total e progressiva, enquanto no trabalho de Leite et al. (2010) observou-se interação entre estes fatores para ambas motilidades. O presente estudo também apresentou diferenças entre os três tempos estudados para motilidade total, enquanto Leite et al. (2010) não encontraram diferenças de motilidade entre 2 e 4 h de equilíbrio para ambas motilidades.

Estas diferenças entre estes estudos provavelmente estão relacionadas às diferenças de "congelabilidade" do sêmen dos animais, de diluidores utilizados e diferenças de métodos de coleta do sêmen (vagina artificial x eletroejaculador). No atual experimento foram utilizados animais de uma central de IA, portanto animais previamente selecionados para congelabilidade e, portanto, uma população mais homogênea (e de alta congelabilidade). No experimento de Leite et al. (2010) foram utilizados animais de congelabilidade desconhecida e provavelmente uma população mais heterogênea. Esta diferença entre populações pode ser verificada pelo CV (coeficiente de variação) experimental. No experimento de Leite et al. (2010) o CV foi ≥ 30%, enquanto no atual experimento o CV foi ≤ 15%, para a maioria das variáveis avaliadas, o que indica uma maior precisão do atual experimento e, portanto, redução do erro experimental.

Um aspecto que dificulta a comparação com trabalhos anteriores é que muitos trabalhos utilizam taxa de resfriamento e congelamento empíricas (não controladas), e método de congelamento artesanal utilizando vapor de nitrogênio. Isto não invalida os experimentos, mas os torna menos precisos e sujeitos a variações externas. Em relação a isto, um importante aspecto do presente estudo e de Leite et al. (2010) foi a utilização de sistemas de congelamento automatizado, o que proporcionou curvas de resfriamento e congelamento altamente controladas. Além disso, a utilização de sistema computadorizado de avaliação da motilidade (CASA) e da citometria de fluxo para avaliação da motilidade e integridade das membranas (respectivamente), facilitando a comparação entre os tempos de equilíbrio com maior precisão que os estudos anteriores. A utilização destes métodos e equipamentos permitiu minimizar ou eliminar a subjetividade das análises e os fatores de confundimento que provavelmente contribuíram para as incertezas geradas nos estudos anteriores, em relação aos efeitos do tempo de equilíbrio sobre a sobrevivência espermática no processo de criopreservação.

Os resultados de motilidade total e progressiva do atual experimento confirmam a suposição levantada por Leite (2008) e Leite et al. (2010) de que resultados satisfatórios de motilidade total (> 30%,

segundo CBRA, 1998) e progressiva podem ser obtidos sem a utilização do tempo de equilíbrio, quando são utilizados animais de alta congelabilidade. Porém, resultados superiores são obtidos quando se realiza o tempo de equilíbrio no processo de criopreservação do sêmen. Por exemplo, no presente experimento foram obtidos valores médios de MOT de 56,6% para os tratamentos sem equilíbrio e 73,7% quando foram utilizadas 6h de equilíbrio.

Em relação ao efeito do diluidor no atual experimento, os resultados de motilidade total e progressiva indicam melhor efeito crioprotetor do meio LDL (8%) em relação aos demais diluidores. Estes resultados corroboram com vários estudos (Moussa et al., 2002; Amirat, 2004; Amirat, 2005; Vera-Munoz et al., 2009) que demonstraram que a utilização do LDL em substituição a gema de ovo na composição de diluidores apresenta vantagens em relação à motilidade pós-descongelamento.

Moussa et al (2002) testaram várias concentrações de LDL e observaram maiores valores de MOT (57,3% vs 27%), VSL e LIN para o diluidor a base de LDL (8%) em relação ao diluidor a base de Gema (Triladyl®). O diluidor a base de LDL apresentou maior motilidade total em relação ao diluidor a base de lecitina de soja (Biociphos®). A concentração de 8% de LDL apresentou os melhores resultados. Estes resultados observados por estes autores (em relação a MOT e a VSL) são similares aos observados no atual experimento.

Amirat et al. (2004) compararam um diluidor contendo LDL e outro comercial Optidyl® (20% de gema), e observaram que a motilidade espermática pós-descongelamento foi significativamente maior para o diluidor com LDL do que utilizando o Optidyl®(54.4% vs 30.2%). Conclui-se que o LDL pode ser uma ótima alternativa para meios quimicamente definidos.

Porém os resultados do atual experimento diferem da maioria dos trabalhos que utilizam CLC na criopreservação do sêmen (Purdy e Graham, 2004a,b; Mocé e Graham, 2006; Amorim et al., 2009). Os resultados demonstraram uma maior motilidade total (uma diferença de 4%, $P<0,05$) para o diluidor LDL do que para a associação LDL^{+CLC}, porém na literatura, a maioria dos trabalhos relata maior motilidade para o sêmen tratado com CLC em relação ao sêmen controle. No atual experimento, não houve diferença entre os diluidores LDL e LDL^{+CLC} em relação a motilidade progressiva (PROG). Além disso, o diluidor L-CLC (diluidor com baixa concentração de LDL e inclusão de CLC) apresentou a menor motilidade total. As razões para estas diferenças serão discutidas mais adiante.

Em relação aos outros parâmetros de motilidade espermática avaliados pelo CASA, no presente experimento, o tempo de equilíbrio não apresentou efeitos significativos ($P>0,05$) sobre as velocidades espermáticas (VAP, VSL e VCL), porém houve efeito significativo do diluidor. O diluidor LDL apresentou os maiores valores de VAP e VCL e os diluidores Gema e LDL^{+CLC} os menores valores. Porém, para VSL observou-se que no tempo T0 o diluidor L-CLC apresentou os maiores valores, e nos tempos T4 e T6 ele não diferiu do diluidor LDL, e estes diluidores apresentaram os maiores valores de VSL. Os menores valores de VSL foram observados para o diluidor Gema. O diluidor LDL^{+CLC} apresentou valores intermediários. O alto valor de VCL (>180) para o diluidor LDL indica movimento circular e uma alta proporção de células hiperativas (o que não é desejável) que foi comprovado pela variável Hiper (%) que apresentou 23% de células hiperativas.

No presente experimento, em relação as demais características do movimento espermático (ALH, STR, LIN, Rapid (%) e Hiper (%)) não foram verificadas interações entre diluidor e tempo de equilíbrio, porém houve efeitos isolados desses fatores. Para BCF observou-se interação significativa entre os fatores.

Estes resultados diferem dos resultados de Leite et al. (2010) que não verificou efeito significativo do tempo de equilíbrio sobre a maioria das características do movimento espermático (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, LIN), porém observaram efeito do tempo de equilíbrio na motilidade total e progressiva do sêmen. Essa diferença pode ser devida provavelmente ao maior controle do erro experimental no presente experimento, uma vez que foi utilizado um grupo mais homogêneo de animais, o que permitiu detectar pequenas diferenças para essas variáveis. Outra provável causa dessa diferença é a utilização de diluidores e métodos de coleta diferentes nos dois experimentos.

Segundo Arruda (2000) há fortes evidências de que para a motilidade progressiva, VAP, VSL, VCL, BCF, STR, LIN e porcentagem de células rápidas, quanto maior for o valor numérico obtido, melhor deverá ser a qualidade espermática para cada uma destas características estudadas.

Em relação ao efeito do tempo de equilíbrio para ALH, STR e LIN, no presente experimento observou-se que houve diferença entre os tratamentos com tempo de equilíbrio (T4 e T6) e aqueles sem tempo de equilíbrio (T0). Para o ALH, observou-se um pequeno aumento (0,3) e para o STR e LIN uma pequena redução (1,5% e 1,4%, respectivamente) para os tratamentos com tempo de equilíbrio, porém não se sabe qual a relevância dessas pequenas diferenças para a qualidade espermática e fertilidade.

Quanto ao efeito do diluidor para estas variáveis, observou-se que o diluidor LDL apresentou maior ALH que os diluidores Gema e LDL^{+CLC}, porém não diferiu do diluidor L-CLC. Em geral, maior valor numérico de ALH não é desejável, pois se traduz em pior qualidade espermática, e pode interferir com a progressão da célula, como demonstrado por Arruda et al. (2003). Porém, este valor foi determinado matematicamente e ainda não foram estabelecidos limites máximos e mínimos para dizer o quanto de deslocamento da cabeça poderia interferir na motilidade progressiva ou mesmo no processo de fertilização do oócito (Celeghini et al., 2008; Leite et al., 2010).

Quanto ao STR e a LIN, o diluidor LDL apresentou os menores valores. Os diluidores com CLC (LDL^{+CLC} e L-CLC) apresentaram os maiores valores para estas características. Estes resultados indicam melhores características do movimento espermática para os diluidores que tiveram inclusão de CLC. Estes resultados foram aparentemente contraditórios uma vez que indicam melhores características do movimento espermático para os diluidores que apresentaram menor motilidade total do que o LDL. Uma possível explicação é que a adição de CLC leva a eliminação de espermatozoides que já apresentavam movimento circular (hiperativas) ou de células em apoptose (moribundas) antes da criopreservação.

Em relação à frequência de batimentos flagelares (BCF), com exceção do diluidor Gema, para os demais diluidores observaram-se menores valores dos tratamentos com equilíbrio (T4 e T6) em relação aos tratamentos sem equilíbrio (T0), isto indica que a não utilização do tempo de equilíbrio estimula os batimentos flagelares. Ao se compar os diluidores observa-se a seguinte ordem de valores: L-CLC > LDL^{+CLC} > LDL > Gema. Os resultados indicam maiores valores de BCF para os

tratamentos com inclusão de CLC. Isto sugere que os diluidores com pré-tratamento com CLC preservam melhor as estruturas flagelares ou que o CLC influencia na produção de ATP e consequentemente estimula a frequência de batimentos.

Uma possível explicação para resultados positivos da adição de CLC sobre a BCF foi fornecida pelo experimento de Purdy e Graham (2004a). Estes pesquisadores, utilizando CLC com colesterol marcado por fluorescência, observaram que apesar de todas as células incorporarem a mesma quantidade de colesterol, diferentes quantidades de colesterol são incorporadas aos diferentes compartimentos de membrana. Isto sugere que uma parte da crioproteção fornecida ao espermatozoide e à motilidade espermática pelo tratamento com CLC pode ser devida a maior incorporação de colesterol às membranas mitocondriais, o que estimularia a produção de ATP e o aumento da BCF.

No geral, observou-se que a adição de CLC ao diluidor LDL levou a redução da motilidade total e dos valores da VAP, VSL, VCL, ALH, e aumento da BCF, STR, LIN. Além disso, provocou uma redução nas porcentagens de células rápidas e de células hiperativas.

Os trabalhos que relatam os benefícios da utilização do CLC na criopreservação e que avaliaram a motilidade por sistema computadorizado (CASA) (Purdy e Graham, 2004a; Mocé e Graham, 2006; Amorim, 2009) não descrevem os efeitos do CLC para as demais características do movimento espermático, o que impossibilita a comparação dos resultados do presente experimento. Outro problema na comparação com trabalhos anteriores que utilizaram CLC na criopreservação de sêmen com o presente experimento é o fato de as taxas de resfriamento e congelamento da grande maioria desses experimentos não serem descritas ou foram realizadas por métodos empíricos (não controladas), e a criopreservação realizada com métodos artesanais utilizando vapor de nitrogênio. A grande maioria dos trabalhos com CLC descreve apenas o resfriamento lento até 5°C durante um período de 2h, e um tempo de equilíbrio de apenas 15 minutos. Não há descrição de curvas precisas ou métodos de controle da temperatura e as curvas de congelamento são baseadas na distância do suporte de palhetas em relação à superfície do nitrogênio liquido.

Em relação à porcentagem de células rápidas (Rapid; %) observou-se que com o aumento do tempo de equilíbrio houve um aumento da proporção de células rápidas, e houve diferença entre os três tempos, sendo que a maior proporção de células rápidas foi observada em T6 e a menor nos tratamentos sem equilíbrio (T0). Em relação aos diluidores o LDL apresentou os maiores valores e o L-CLC os menores, estabelecendo a seguinte ordem: LDL > LDL^{+CLC} > Gema > L-CLC. O diluidor LDL apresentou uma diferença de 13% em relação à Gema.

Amirat-Briand et al. (2010), comparando um diluidor à base de LDL e um diluidor comercial a base de Tris-gema (Triladyl®), observaram uma maior motilidade total para o LDL (58,3% vs. 46%), e uma motilidade progressiva 2x superior para o diluidor LDL (34,7% vs. 16,0%), além disso, uma porcentagem de células rápidas de 45,3% para o LDL e de 27% para o diluidor Gema. Os resultados deste experimento foram comparáveis aos do presente experimento.

Em relação a porcentagem de células hiperativas (Hiper; %) os resultados demonstram um pequeno, porém significativo ($P<0,05$), aumento quando se utilizou o tempo de equilíbrio em relação ao controle (T0). O tratamento com o diluidor LDL apresentou a maior porcentagem de células hiperativas e diferiu dos demais diluidores. A exata causa desta diferença

entre os diluidores não é conhecida, porém, supõe-se que isto foi devido à melhor capacidade crioprotetora do LDL, que permitiu a sobrevivência de células hiperativadas (células teoricamente mais susceptíveis aos danos da criopreservação).

Estes resultados diferem dos resultados de Amirat-Briant et al. (2010), que observaram menor proporção de células hiperativas para o diluidor a base de LDL (5,3% vs 6,3%) em relação ao diluidor Tris-gema. Esta diferença entre estes estudos talvez se deva à diferença de padrões utilizados para a detecção da hipermotilidade, porém no estudo anterior não foi divulgado o padrão utilizado.

Ao comparar o meio LDL com o meio LDL^{+CLC} quanto à porcentagem de células hiperativas, observou-se que quando se realizou o pré-tratamento com CLC ocorreu uma redução significativa (10%) da proporção de células hiperativas. As causas dessa redução parecem estar ligadas a ação "decapacitante" do colesterol (CLC). Os processos de congelação e descongelação induzem a mudanças semelhantes à capacitação (criocapacitação), e os danos associados à criocapacitação parecem suficientes para facilitar e/ou provocar uma capacitação funcional. Dentre essas mudanças estão o aumento das células hiperativas (Cormier e Bailey, 2003; Zaffalon, 2009). Estudos demonstram que a capacitação espermática pode ser inibida e que os espermatozoides podem ser até mesmo decapacitados pela adição de lipossomos contendo colesterol, uma vez que estes impedem a perda de colesterol da membrana (Purdy e Graham, 2004b). Em espermatozoides humanos, foi demonstrado que o excesso de colesterol prejudica a aquisição da hipermotilidade (Buffone et al., 2009).

Outra hipótese levantada para explicar esta diferença é a melhor atividade crioprotetora do LDL, que permitiu a sobrevivência de células hiperativadas que estavam presentes no sêmen *in natura*. Andrade (2009) demonstrou que o processo de criopreservação lesa em maior intensidade as categorias de células que estão capacitadas, hiperativadas ou com o acrossoma reagido, mostrando deste modo que a criopreservação tem um efeito seletivo. A criopreservação seleciona certas populações, levando deste modo, o sêmen descongelado a possuir uma população mais homogenia. Andrade (2009), no sêmen equino, verificou uma redução de 71% na população de células hiperativas após a criopreservação (14,9% vs. 4,3%).

7.2 Análises por citometria de fluxo

7.2.1 Integridade das membranas plasmática e acrossomal

No presente trabalho observou-se um efeito benéfico do tempo de equilíbrio para a manutenção da integridade da membrana plasmática e acrossomal. Em relação à porcentagem de espermatozoides com acrossoma e membrana plasmática intacta (AIMPI), observou-se a existência de uma interação ($P<0,05$) entre tempo de equilíbrio e o diluidor. A não realização do tempo de equilíbrio (T0) foi prejudicial para a integridade das membranas, e impediu a manifestação máxima do efeito crioprotetor dos diluidores, uma vez que apresentou a menor proporção de células AIMPI. Um achado importante foi que no tempo T0 o diluidor LDL apresentou a maior proporção de AIMPI, diferindo dos demais diluidores, o que indica uma maior capacidade crioprotetora do LDL a 8%.

Observou-se que o tempo de equilíbrio é necessário para todos os diluidores. Porém, para os diluidores Gema e LDL houve diferenças pequenas (4,2%), porém significativas, entre os tempo de equilíbrio de 4h e 6h. Para estes diluidores houve um aumento progressivo da motilidade de T0 a T6, ou seja, os três tempos de equilíbrio

foram diferentes. Porém, para os diluidores LDL^{+CLC} e L-CLC o aumento de 4 para 6h de equilíbrio não resultou em aumento de integridade das membranas. O diluidor LDL (8%) apresentou o melhor efeito crioprotetor, pois apresentou a maior integridade das duas membranas em todos os tempos, apesar de não diferir de LDL^{+CLC} no tempo T4. O tratamento LDL com 6h apresentou a maior porcentagem de células com ambas membranas intactas (o resultado mais desejável).

Comparando os tempos de equilíbrio T0 e T6 para os diferentes diluidores, observamos que para o diluidor Gema houve uma diferença de 17% na porcentagem de células AIMPI (o que representa um incremento de 91,4%), para o LDL 18,2% (aumento de 71,4%), para o LDL^{+CLC} 16,8% (aumento de 79,2%), para o L-CLC 12% (aumento de 63,5%).

Os resultados do presente experimento corroboram com os achados de Leite et al. (2010) que concluíram que o tempo de equilíbrio é necessário para a preservação da integridade das membranas e que 4 h de equilíbrio é um tempo adequado para se obter uma alta sobrevivência espermática, independente do diluidor utilizado. Porém, os resultados do atual experimento sugerem que, dependendo do diluidor utilizado, um maior tempo de equilíbrio (6h) pode trazer algum benefício.

A maioria dos protocolos de criopreservação de sêmen bovino estabelece um tempo de equilíbrio de 3-4 h, assim, o sêmen deve ser congelado no mesmo dia da coleta. (Muiño et al., 2007). Algumas recomendações do uso de tempo de equilíbrio foram baseadas em testes de fertilidade, como por exemplo, em uma extensiva revisão de literatura de Pickett and Berndtson (1978). No entanto, os dados de fertilidade apresentados na maioria das publicações têm limitações graves, quando utilizados para validar um método diagnóstico. O teste de fertilidade ideal deveria ser realizado "nos limites da curva de dose-resposta", uma vez que o efeito de uma característica (ou defeito) espermática compensável pode ser mascarado pelo uso de um grande número de espermatozoides por dose inseminante (Amann e Hammerstedt, 2002). Um teste de fertilidade à campo de grande escala, utilizando baixas doses inseminante, é um método muito laborioso e caro para se testar novos diluidores. Uma abordagem mais simples seria a utilização da citometria de fluxo para avaliar o efeito dos diluidores quanto à viabilidade e longevidade espermáticas pós-descongelamento para um grande número de touros e ejaculados; Se os resultados iniciais forem encorajadores, então um estudo de fertilidade a campo pode ser realizado posteriormente. A citometria de fluxo permite a análise de milhares de espermatozoides por amostra, com uma precisão muito maior do que é possível se obter com a avaliação subjetiva da motilidade por microscopia ou mesmo através do uso de sistemas computadorizados CASA (Christensen et al, 2005; Muiño et al, 2007; Leite et al., 2010).

O tempo de equilíbrio de 4 h geralmente utilizado pelas centrais de IA, é um intervalo de tempo conveniente para que grandes volumes de sêmen diluído possam ser envasados e preparados para congelação (Leite et al., 2010). No entanto, alguns estudos indicam que a incubação do sêmen "overnight" (até 18 h) antes do congelamento resulta em um aumento da fertilidade (Pickett e Berndtson, 1978; Foote e Kaproth, 2002). Um exemplo é o estudo de Graham et al. (1957) que, utilizando cerca de 1000 inseminações por tratamento, relataram taxas de não-retorno aos 75d de 63,4; 65,2 e 67,8%, respectivamente, para 4, 8 e 12 h de equilíbrio, porém houve diferença significativa apenas entre 4 e 12h, sugerindo que mais de 4h de equilíbrio foi benéfico para a fertilidade do sêmen. Os resultados do atual experimento dão suporte a esta observação, porém não podemos

concluir sobre tempos superiores à 6h. Novos estudos, utilizando tempos de equilíbrio mais longos, são necessários para esclarecer se tempos de equilíbrio superiores a 6 h são benéficos.

Quanto à população de células com membrana plasmática intacta (MPI), observamos exatamente o mesmo padrão da AIMPI, valores muito próximos, e correlação alta e positiva entre estes valores, indicando que a grande maioria (quase totalidade) das células que apresentaram membrana plasmática intacta, também apresentam acrossomo intacto.

Quanto à integridade da membrana acrossômica, os resultados do atual experimento apresentam indícios de uma maior capacidade crioprotetora do diluidor LDL^{+CLC}, porém este diluidor não diferiu dos diluidores Gema e LDL, diferindo apenas do diluidor L-CLC. Esta diferença provavelmente é devida a concentração muito baixa de LDL neste último diluidor (L-CLC) o que comprometeu a integridade acrossômica. Os tratamentos com tempo de equilíbrio apresentaram melhor atividade crioprotetora do acrossomo, em relação aos tratamentos sem tempo de equilíbrio, independentemente do diluidor utilizado.

Os resultados do presente experimento corroboram com vários estudos que indicam que o uso do LDL, na composição de diluidores, apresenta vantagens em relação a outros diluidores para a integridade das membranas na espécie bovina (Amirat et al., 2005; Vera-Munoz, 2009) e outras espécie (Benchariff, 2008; Moustacas, 2011).

Amirat et al. (2005) compararam os diluidores Triladyl® (Gema), LDL e Biociphos® (lecitina de soja) em diferentes etapas do processo de criopreservação. Utilizando microscopia eletrônica, observaram que após 4 h de incubação a 4°C no diludor Triladyl® apenas 11,6% das células estavam intactas enquanto que para o LDL e o Biociphos® 89,7% e 46,9% das células estavam intactas.

Vera-Munoz et al. (2009) estudaram os efeitos da alta diluição sobre a integridade da membrana plasmática, utilizando 2 horas de equilíbrio, dois diluidores comerciais e um diluidor a base de LDL. Para cada diluidor foram testadas três diluições diferentes $120x10^6$, $60x10^6$ e $20x10^6$ sptzs/mL. Os resultados permitiram concluir que as altas diluições diminuem a sobrevivência dos espermatozoides pós-criopreservação nos três diluidores testados. No entanto, o diluidor com 8% de LDL ofereceu uma melhor proteção do que o Triladyl® e o Bioxcell®. O diluidor 8% LDL apresentou 52,6%; 41,4% e 30,3% de integridade da membrana plasmática para as três diluições, respectivamente. No presente estudo, utilizando 6h de equilíbrio, obtive-se 43,7% de células integras para o diluidor LDL, utilizando uma concentração de $30x10^6$ sptzs/mL. Estes resultados foram semelhantes aos do estudo de Vera-Munoz et al. (2009).

Porém em relação à ação da CLC sobre a integridade das membranas espermáticas e a motilidade pós-descongelamento, os resultados do presente estudo diferem da maioria dos estudos que utilizaram as CLC na criopreservação do sêmen (Purdy e Graham, 2004a,b; Mocé e Graham, 2006; Amorim et al., 2009; Oliveira et al., 2010). A maioria destes estudos relata que a utilização do pré-tratamento com CLC resulta em maior porcentagem de células integras do que o diluidor controle. Porém, esses estudos anteriores foram realizados com diluidores a base de gema de ovo. Não existem relatos do uso do uso de CLC em diluidores a base de LDL.

No presente trabalho observou-se que nos tempos T0 e T6 o diluidor LDL^{+CLC} apresentou menor porcentagem de células com membranas integras do que o diluidor LDL, indicando que o pré-tratamento com CLC, antes da inclusão do diluidor LDL,

teve um efeito prejudicial para a sobrevivência espermática nesses dois tempos. A causa exata deste efeito prejudicial não foi possível estabelecer no presente experimento, porém, baseado nos resultados encontrados algumas hipóteses foram levantadas. O gráfico da Figura 21 permite compreender melhor os fatores envolvidos nessa resposta.

Observa-se que quando se utiliza a concentração ideal de LDL (8%) e 6h de equilíbrio, o tratamento prévio com CLC não apresentou efeito benéfico, e sim reduziu a integridade da membrana plasmática e acrossomal, o que resultou numa diferença de 5,7% na integridade das duas membranas (em relação ao diluidor LDL sem CLC).

Uma das hipóteses levantadas para explicar esse efeito prejudicial do CLC foi que, no sêmen de touros de alta congelabilidade um aumento *excessivo* da concentração de colesterol na membrana pode ser prejudicial por tornar a membrana mais frágil (uma vez que aumenta a rigidez da membrana na temperatura de 37°C) após o processo de criopreservação (ou seja, no pós-descongelamento). O uso das CLC provavelmente é benéfico para o sêmen de touros de baixa congelabilidade, porém pode ser prejudicial (dependendo da dose) ao sêmen de alta congelabilidade (como foi o caso dos touros deste experimento).

Outra hipótese é que o tratamento prévio do sêmen com CLC estabiliza a membrana e reduz a taxa de aquisição de fosfolipídios protetores do LDL purificado e, assim, impede a ação máxima do efeito protetor do LDL na criopreservação.

Uma informação importante foi obtida em um teste preliminar ao atual experimento (Leite et al., 2011, resultados não publicados). Em um teste à campo, com um número reduzido de animais (n=3), comparou-se um diluidor a base de Tris, sem nenhuma fonte de lipoproteína (com 7% de glicerol), ao qual foi adicionado CLC, com dois diluidores, um a base de gema e outro a base de LDL (8%). O sêmen criopreservado com meio que continha apenas CLC (sem lipoproteínas) não teve atividade crioprotetora, (100% dos espermatozoides pós-descongelamento encontravam-se imóveis, avaliados visualmente), enquanto o sêmen criopreservado com os diluidores a base de Gema e LDL apresentaram 30% e 40% de motilidade, respectivamente. Devido a estes resultados preliminares, durante o planejamento experimental optou-se por substituir este diluidor pelo L-CLC, um diluidor que possui apenas 0,8% de LDL (concentração 10x menor do que a concentração ideal), o que permitiria dessa forma minimizar ao máximo o efeito crioprotetor do LDL e assim permitir verificar o possível efeito protetor da CLC.

No presente experimento, quando se utilizou o pré-tratamento com CLC (dose de 1,5 mg de CLC/ 120 x 10^6 sptz) e uma concentração de LDL 10x menor que a concentração ideal (8% estipulada pelo trabalho de Moussa et al., 2002) o sêmen apresentou porcentagens de motilidade e integridade de membrana acima do esperado.

Comparando os resultados do atual experimento com os de Moussa et al. (2002), estes pesquisadores ao reduzirem a concentração de LDL de 10% para 2,5%, (redução de 4x) utilizando 2 h de equilíbrio, observaram uma queda da motilidade total de *aproximadamente 50%*. No presente experimento, quando se reduziu a concentração de LDL de 8% para 0,8% (10x), no diluidor L-CLC, nos tratamentos sem tempo de equilíbrio, observou-se uma menor queda de motilidade em relação ao diluidor LDL (8%) do que a observada por Moussa et al. (2002).

Para este diluidor (L-CLC) em T0 observou-se uma redução percentual de *apenas 32 %* na motilidade total e uma redução de *26%*

para porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal intactas (AIMPI), quando comparado com o diluidor LDL (8%)**.** Isto é um indicativo que o CLC apresentou uma atividade crioprotetora, quando associado a níveis muito baixos (subótimos) de LDL, porém esta crioproteção foi inferior a dos demais tratamentos (Gema, LDL e LDL^{+CLC}). Provavelmente este nível de crioproteção observado não se deve apenas à baixa concentração de LDL (0,8%) e sim a associação do efeito crioprotetor fornecido pelo pré-tratamento com CLC. Por isso, concluímos que o CLC pode ser utilizado apenas como um aditivo e não como o único crioprotetor.

Levantou-se a hipótese de que, para concentrações de LDL inferiores a concentração ótima de 8%, a utilização da CLC é benéfica para o sêmen. É possível que exista uma interação entre os níveis de LDL e os níveis da CLC, porém para se estabelecer a concentração ideal dessas substâncias, são necessárias novas pesquisas.

É possível que o LDL sozinho, com 6h de equilíbrio, forneça a proporção correta de colesterol e fosfolipídios necessários para atingir uma taxa de sobrevivência espermática ótima, e que a adição de colesterol através da CLC interfira na ação protetora do LDL, impedindo a adição de fosfolipídios à membrana, em uma taxa ótima.

No atual experimento, em relação ao tempo de equilíbrio, observou-se que entre 4h e 6h de equilíbrio parece ocorrer uma tendência a estabilização na taxa de sobrevivência espermática, esta é muito mais evidente para os diluidores com CLC. Isto sugere que a partir deste ponto ocorre uma estabilização da porcentagem de células vivas, provavelmente relacionada com a estabilização da membrana. A membrana estabilizada com CLC provavelmente não permita mais a adição de fosfolipídios advindos das moléculas de LDL do diluidor.

Um novo mecanismo de proteção do espermatozoide pelo LDL da gema de ovo foi proposto recentemente por Manjunath et al. (2002) e por Bergeron et al. (2004). Estes estudos demonstraram que o LDL da gema de ovo nos diluidores protege os espermatozoides de duas formas. Primeiro, a associação do LDL com as BSP's protege o espermatozoide por evitar que essas proteínas do plasma seminal se liguem ao espermatozoide a causem danos à membrana pela remoção de lipídios (colesterol e fosfatidilcolina). Segundo, os lipídios da fração de lipoproteína de baixa densidade ou a molécula inteira de LDL se associariam à membrana, preservando a integridade da membrana plasmática durante a preservação do sêmen. Bergeron et al. (2004) observaram que quando os espermatozoides foram incubados com diluidores a base de gema de ovo ou LDL houve uma redução da associação das proteínas BSP's à superfície dos espermatozoides, associado a um ganho gradual de colesterol e fosfolipídios pela membrana espermática. Após 8h de incubação a 4°C este ganho atingiu um platô (estabilizando-se). Uma vez que esses mecanismos de ação do LDL são tempo e concentração-dependentes e influenciados pela temperatura, isto poderia explicar porque os diluidores à base de LDL ou Gema requerem um intervalo de equilíbrio adequado para manifestar a sua ação crioprotetora máxima.

No presente experimento, considerando o período de resfriamento (1h e 15min) e as 6h de equilíbrio em T6, nos aproximamos do tempo de 8h sugerido por Bergeron et al. (2004) em que ocorreria este platô.

Portanto, parece que a proporção entre colesterol e fosfolipídios é a chave para compreensão da ação das CLCs no processo de criopreservação, e um futuro estudo da composição lipídica das membranas do

espermatozoide após a criopreservação pode esclarecer os resultados encontrados neste experimento.

Entretanto, permanece uma dúvida: porque em estudos anteriores a adição de CLC ao sêmen foi benéfica? Em estudos anteriores (Purdy e Graham, 2004a,b; Mocé e Graham, 2006; Amorim et al., 2009; Oliveira et al, 2010) foram utilizados diluidores a base de gema de ovo em concentrações de 20% ou mesmo em concentrações menores como 10% (Amorim et al., 2009) e 2,5% (Purdy e Graham, 2004b). Segundo Moussa et al.(2002) 20% de gema apresenta cerca de 6-7% de LDL (inferior a concentração ótima), e concentrações inferiores de Gema reduzem a concentração de LDL no diluidor para níveis abaixo da concentração ótima de 8% de LDL, o que permitiria uma ação sinérgica benéfica do CLC.

Deve-se lembrar também que a gema de ovo na verdade é uma mistura de várias substâncias, com componentes que são benéficos (LDL) e outros que são prejudiciais ao processo de criopreservação. Um desses componentes prejudiciais são as lipoproteínas de alta densidade (HDL) e, como demonstrado por Pace e Graham (1974), o HDL é considerado tóxico para o espermatozoide. O HDL, assim como a heparina, induz a capacitação ao se ligar à moléculas de colesterol, causando seu efluxo da membrana espermática (Thérien et al., 1998; Manjunath e Thérien, 2002). Portanto a inclusão do colesterol através do uso das CLC pode compensar este efeito lesivo do HDL da gema de ovo, sendo uma explicação plausível para este possível efeito diferencial do CLC em relação à Gema e ao LDL purificado.

Alguns estudos demonstraram que o conteúdo elevado de colesterol pode ser prejudicial ao espermatozoide. Parks et al. (1981) avaliaram o efeito da adição de lipossomos ao sêmen e concluiram que os lipossomos de fosfatidilcolina da gema protegem os espermatozoides do *cold-shock*, durante o resfriamento e armazenamento a 4°C, porém a adição de colesterol aos lipossomos reduziu a efetividade da proteção fornecida por estes.

Uma alta concentração de colesterol parece contribuir para a infertilidade do sêmen de humanos e garanhões (Sugkraroek et al.,1991; Brinsko et al., 2005), por induzir um estado de decapacitação, inibindo a reação acrossômica. Há evidências de que a capacidade fecundante do espermatozoide é influenciada pela relação colesterol/fosfolipídios na membrana plasmática da célula espermática e que a fusão da membrana é inibida pelo colesterol (Cross, 1998). Em contraste com a evidência no garanhão, a adição de colesterol no sêmen bovino não afetou significativamente a fertilidade in vivo ou in vitro (Purdy e Graham, 2004b).

7.2.2 Peroxidação das membranas espermáticas pós-descongelamento

Os resultados das análises de peroxidação lipídica demonstraram que o único efeito significativo foi o de diluidor. Os tempos de equilíbrio não diferiram quanto a peroxidação lipídica. O diluidor L-CLC, com baixa concentração de LDL (0,8%), apresentou a maior peroxidação lipídica das membranas de espermatozoides viáveis (MPI), indicando que a proteção contra danos pela formação de EROs durante o congelamento foi muito baixa para este diluidor. O diluidor que apresentou a menor peroxidação lipídica das membranas foi o diluidor Gema. Comparando o L-CLC com o diluidor Gema observou-se um aumento de 66% na intensidade de peroxidação das membranas, esta observação é plausível, uma vez que este diluidor apresentou a menor taxa de integridade de membranas. Os tratamentos com LDL e LDL^{+CLC} não diferiram entre si, porém apresentaram maior peroxidação das membranas do que os

tratamentos que utilizaram os diluidores a base de Gema (um aumento de 21,5%).

Os resultados para os diluidores a base de LDL (8%) são aparentemente contraditórios, pois indicam maior peroxidação para os diluidores que apresentaram maior taxa de sobrevivência (em relação à motilidade e integridade das membranas) quando comparados aos diluidores à base de Gema. Não foi possível determinar no presente experimento as causas exatas dessa maior peroxidação lipídica para o LDL. Não foram encontrados na literatura trabalhos sobre a peroxidação lipídica de espermatozoides criopreservados com meios a base de LDL.

Um das suposições levantadas para esta maior peroxidação lipídica é que o processo de purificação do LDL pode retirar substâncias antioxidantes presentes na gema de ovo, ou que a manipulação do LDL provoque uma pequena, porém significativa, peroxidação dos lipídios presentes no LDL. Sugere-se que a adição de antioxidantes ao meio a base de LDL pode trazer benefícios no processo de criopreservação do sêmen. Outra hipótese, é que a alta capacidade crioprotetora do LDL levou a sobrevivência de espermatozoides que já apresentavam alterações das membranas mitocondriais antes da criopreservação, o que justificaria a maior porcentagem de células hiperativas encontradas no diluidor LDL e a maior peroxidação lipidica.

Na literatura existem relatos que sugerem uma atividade antioxidante das CLC (Mocé et al., 2010a), porém os resultados encontrados para o diluidor LDL^{+CLC} não indicaram nenhuma ação antioxidante direta, visto que os diluidores com e sem CLC (LDL e LDL^{+CLC}) não diferiram quanto a peroxidação das membranas.

As EROs geradas no processo de criopreservação podem ter como origem as mitocôndrias, estas são frequentemente identificadas como estruturas danificadas após o processo de congelação/descongelação. As mitocôndrias, quando lesadas, são incapazes de realizar o metabolismo oxidativo de forma correta, levando a geração de EROs (Ball, 2008). No atual experimento encontrou-se uma correlação baixa e positiva (r = 0,23) entre a peroxidação lipídica e a frequência de batimentos flagelares (BCF). Uma vez que o aumento da BCF pode estar ligado a maior atividade mitocondrial e produção de ATP, esta correlação baixa pode indicar que uma maior atividade mitocondrial pode levar a uma maior produção de EROs quando a mitocondria apresenta-se lesada.

O sêmen possui um sistema redox onde há um delicado balanço entre o potencial antioxidante do plasma seminal e a atividade pró-oxidante do metabolismo dos espermatozoides. 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 espermatozoide bovino, levam a uma diminuição da glutationa que não é compensada pelo diluidor (Stradaioli et al., 2007; citado por Zaffalon, 2009).

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

7.2.3 Estabilidade da membrana plasmática

Os resultados da associação sondas fluorescentes H33342, Yo-Pro-1 e Merocianina 540, que avalia a estabilidade de membrana (grau de desorganização da membrana), foram inesperados.

Quanto a porcentagem de células com membrana plasmática alterada (ou lesada e consideradas inviáveis, Yo-Pro (+)), nos tratamentos em que foi realizado o tempo de equilíbrio (T4 e T6) observou-se uma redução significativa da população dessas células, e os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0, controle) apresentaram os maiores valores de células Yo-Pro(+), diferindo de T4 e T6 para a maioria dos diluidores. Porém, não houve diferença entre os tempos para o diluidor L-CLC. Este resultado confirma a importância do tempo de equilíbrio para sobrevivência espermática no processo de criopreservação, dando suporte aos resultados encontrados por Leite et al. (2010).

Porém, os resultados da porcentagem de células Yo-Pro(+) para o diluidor L-CLC (com baixa concentração de LDL) apresentou resultados surpreendentes. Apesar de este diluidor apresentar resultados de motilidade e integridade de membrana considerados próximos aos valores do diluidor Gema (não apresentou diferenças nos tempos T0 e T4 em relação a porcentagem de células integras pela coloração pela associação H33342 + PI +FITC-PSA), o resultado da porcentagem de células Yo-Pro(+) indica que a maioria das células preservadas neste diluidor, na realidade, apresentava a membrana plasmática alterada (97,5% das células).

Não se sabe a causa exata desta grande diferença entre as sondas. Uma hipótese levantada foi uma possível interação entre a sonda Yo-Pro-1 e o diluidor L-CLC, ou seja, um problema da técnica, porém, novos estudos são necessários para testar esta hipótese. No entanto, supõe-se que a causa mais provavel está ligada a alta peroxidação das membranas celulares e à baixa concentração de LDL no crioprotetor L-CLC. Isto demonstra que, apesar das células parecerem intactas pela coloração por iodeto de propídio (PI), provavelmente a permeabilidade da membrana encontra-se alterada, indicando um processo de apoptose, ou seja, são células de baixa longevidade (“moribundas”).

A apoptose é um processo distinto da necrose, ou morte celular, por alterações morfológicas e bioquímicas características, incluindo compactação e fragmentação da cromatina nuclear, o encolhimento do citoplasma e perda da assimetria de membrana. Além disso, durante a apoptose a membrana plasmática torna-se ligeiramente permeável. As células apoptóticas se tornam permeáveis ao YO-PRO-1, porém permanecem impermeáveis ao iodeto de propídio (PI), um corante que marca células mortas. Assim, a utilização do corante YO-PRO-1 e do corante PI em conjunto fornece um indicador sensível para a apoptose (Idziorek et al., 1995; Molecular Probes, Inc., 2010).

Estes resultados demonstram que apesar da aparente crioproteção fornecida pela inclusão do colesterol à membrana através das CLCs, a utilização de concentrações adequadas de lipoproteínas é essencial para a manutenção da viabilidade celular pós-descongelamento. Em baixas concentrações de LDL com aumento do colesterol da membrana, as células podem até sobreviver ao processo de criopreservação, porém a longevidade celular encontra-se comprometida.

Em relação aos demais diluidores, não houve diferença entre os tempos T4 e T6 para os diluidores Gema e LDL. Apenas para o diluidor LDL^{+CLC} houve diferença entre os três tempos, sendo que T6 apresentou os menores valores de células alteradas (lesadas,Yo-Pro-(+)). Quando se observa dentro de tempo, o diluidor L-CLC apresentou os maiores valores em todos os tempos, diferindo dos demais diluidores. Os diluidores Gema, LDL e LDL^{+CLC} não diferiram entre si (Gema = LDL = LDL^{+CLC}).

Em relação à porcentagem de células viáveis não capacitadas (com membrana estável, Meroc (-)), houve efeitos significativos de tempo de equilíbrio e do diluidor. Quando se observa dentro de diluidor, os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0, controle) apresentaram os menores valores de células viáveis estáveis, diferindo-se de 4 e 6h para a maioria dos diluidores. Porém, não houve diferença entre os tempos 0h e 4h para o diluidor L-CLC, mas 6h diferiu dos demais tempos para este diluidor. Para os diluidores Gema, LDL e LDL^{+CLC} não houve diferença entre os tempos T4 e T6. Estes resultados confirmam os resultados observados para as outras sondas, indicando que o tempo de equilíbrio é importante para a preservação da integridade da membrana plasmática, uma vez que aumenta a proporção de células viáveis não capacitadas pós-descongelamento.

Observando-se dentro de tempo, os diluidores a base de LDL a 8% (LDL e LDL^{+CLC}), não diferiram entre si, e apresentaram as maiores porcentagens de células viáveis não capacitadas (Meroc -) em todos os tempos, porém em T0 o diluidor LDL^{+CLC} não diferiu de Gema e nem do LDL. Nos tempos T4 e T6 Gema apresentou menores valores que os diluidores a base de LDL (LDL e LDL^{+CLC}), porém foi superior ao L-CLC. Em todos os tempos o diluidor L-CLC apresentou os menores valores de células Meroc (-). Os resultados encontrados indicam que os diluidores a base de LDL apresentam melhor capacidade crioprotetora do que os diluidores a base de gema de ovo. Estes resultados são similares aos achados de vários trabalhos (Amirat et al., 2005; Vera-Munoz, 2009; Benchariff, 2008; Moustacas, 2011) que indicam uma superioridade dos meios a base de LDL, em relação aos meios a base de Gema de ovo, tanto em relação a carcterísticas de motilidade quanto para a integridade das membranas espermáticas.

Os resultados encontrados para o diluidor L-CLC, indicam que as Ciclodextrinas Pré-carregadas com Colesterol (CLC) sozinhas ou com baixas concentrações de LDL não protegem as membranas espermáticas dos efeitos lesivos da criopreservação e, portanto, não podem ser utilizadas como único crioprotetor. Para o possível efeito protetor do pré-tratamento com CLC se manifestar parece ser necessária uma proporção adequada de lipoproteínas no meio diluidor.

Os resultados sugerem que, pelo menos para touros de alta congelabilidade, as LDL sozinhas são capazes de fornecer a proporção correta de colesterol e fosfolipídios necessários para atingir uma taxa de sobrevivência espermática adequada. A adição de colesterol através do CLC interfere na ação protetora do LDL, reduzindo a porcentagem de células integras nos tempo T0 e T6, porém não se observou efeito das CLC sobre a porcentagem de células viáveis não capacitadas. Entretanto, para a manifestação máxima do efeito protetor das LDLs é necessário que o sêmen diluído seja submetido a um tempo de equilíbrio adequado.

Os resultados do presente experimento corroboram com os achados de Leite et al. (2010) de que o tempo de equilíbrio é necessário para a preservação da integridade das membranas e que 4 h de equilíbrio é um tempo adequado para se obter alta sobrevivência espermática, independente do diluidor utilizado. Porém, os resultados do atual experimento sugerem que, dependendo do diluidor utilizado, um maior tempo de equilíbrio (6h) pode trazer algum benefício para a motilidade e integridade das membranas dos espermatozoides.

8 CONCLUSÕES:

1 – O tempo de equilíbrio é necessário para preservação da motilidade total, da motilidade progressiva e da integridade das membranas plasmática e acrossomal no processo de criopreservação do sêmen bovino, independentemente do diluidor utilizado, porém não possui efeito sobre a intensidade de peroxidação lipídica.

2 – A adição de colesterol através do pré-tratamento do sêmen com Ciclodestrinas carregadas com Colesterol (CLC) não permitiu uma redução do tempo de equilíbrio.

3 – A adição de CLC ao diluidor LDL não reduziu a intensidade de peroxidação dos lipídios da membrana espermática, porém reduziu o percentual de células hiperativas.

4 – Espermatozoides criopreservados com diluidores a base de LDL (LDL, LDL^{+CLC}, L-CLC) apresentaram maior intensidade de peroxidação dos lipídios das membranas espermáticas que os criopreservados com diluidor a base de gema de ovo.

5 – A adição de CLC a diluidores a base de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) purificadas da Gema de ovo de galinha, reduziu a sobrevivência espermática, avaliada pela motilidade total e pela Integridade das membranas plasmática e acrossomal.

6 – Registrou-se efeito de interação entre os diluidores e os tempos de equilíbrios que influenciou a sobrevivência espermática, avaliada pelo percentual de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas.

7 – O meio diluidor a base de LDL, na concentração 8% (na matéria seca) apresentou a melhor atividade crioprotetora, com maior motilidade total e progressiva, maiores velocidades do movimento espermático (VAP, VSL e VCL), e a maior integridade das membranas plasmática e acrossomal.

8 – O tempo de 4 h de equilíbrio é um tempo adequado para se obter uma alta sobrevivência espermática, independente do diluidor utilizado, porém, diluidores a base de Gema e LDL, podem se beneficiar de um maior tempo de equilíbrio (6h).

9 – As Ciclodextrinas pré-carregadas com Colesterol (CLC), sozinhas ou associadas a baixas concentrações de LDL, não protegem adequadamente as membranas espermáticas dos efeitos lesivos da criopreservação e, portanto, não podem ser utilizadas como único crioprotetor.

10 - O tratamento utilizando o diluidor LDL (8%) e 6h de equilíbrio, no processo de criopreservação do sêmen bovino, apresentou a melhor taxa de sobrevivência espermática.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGCA, Y.; CRITSER, J. K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. *Seminars in Reproductive Medicine*, v. 20, n. 1, p. 15-23, 2002.

AIRES, V.A.; HINSCH, K-D.; MUELLER-SCHLOESSER, F. et al. 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.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas.* Sociedade Civil Mamirauá: Belém, Pará-Brasil. 2007. 324p.

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

AITKEN, R. J.; PATTERSON, M.; FISHER, H. et al. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Journal Cell Science*, v. 108, p. 2017-2025, 1995.

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. Detection of differences in fertility. *Journal of Andrology*, v. 23, n. 3, p. 317–325, 2002.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Sci.*, v. 7, n. 3, p. 145–174, 1987.

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L. et al. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, v. 61, n. 5, p. 895-907, 2004.

AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINTURIER, D. et al. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*, v. 129, p. 535–543, 2005.

AMIRAT-BRIAND, L.; BENCHARIF, D. VERA-MUNOZ, O. et al. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial inseminations. *Animal Reproduction Science*, v. 122, p. 282–287, 2010.

AMORIM, E.A.M.; GRAHAM, J.K.; SPIZZIRI, B. et al. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, v. 58, p. 210–214, 2009.

ANDRADE, A. F. C. *Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em espermatozoides criopreservados de equinos.* 2009. 132f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). São Paulo.

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

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>. Acessado em: 05 dez 2011.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. et al. Evaluation of effects of extenders and cryoprotectants on equine spermatozoa using computer-assisted sperm analyses (CASA) and flow cytometry. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, suplemento, p. 228-229, 2003.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C. et al. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. *Anais*... São Paulo: Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, 2004. p. 166-179.

ASHIZAWA, K.; WISHART, G.J.; RANASINGHE, A.R.A.H. et al. Protein phosphatase-type 2B is involved in the regulation of the acrosome reaction but not in the temperature-dependent flagellar movement of fowl spermatozoa. *Reproduction*, v.128, n. 6, p. 783-787, 2004.

ATGER, V. M.; MOYA, M. L.; STOUDT, G. W. et al. Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 99, n. 4, p. 773-780, 1997.

AUSTIN, C. R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sic.* Res. [B] v. 4, p. 581-596, 1951.

BAAS J.W.; MOLAN P.C.; SHANNON P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 68,n. 2, p. 275-280, 1983.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, v. 107, p. 257-267, 2008.

BALL, P.J.H; PETERS, A.R. Artificial insemination. In:__. *Reproduction in cattle*. 3. ed. Oxford: Blackwell Pub., 2004. Cap. 10, p. 124-133.

BAMBA, K.; CRAN, D.G. Effect of rapid warming of boar semen on sperm morphology and physiology. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 75, n. 1, p. 133-138, 1985.

BAMBA, K.; CRAN, D.G. Effect of rapid warming of bull and rabbit semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 82, n. 2, p. 501-507, 1988.

BARACALDO, M.I.; BARTH, A.D.; BERTRAND, W. Steps for freezing bovine semen: From semen collection to the liquid nitrogen tank. In: ***IVIS Reviews in Veterinary Medicine***, I.V.I.S. (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY. Last updated: 30-Jan.-2007. Disponível em: <www.ivis.org>. Data de acesso: 15 abr. 2012.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. Normal Bovine Spermatogenesis and Sperm Maturation. In:__. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. 1ª ed. Ames: Iowa State University Press, 1989. Cap. 3, p. 19-88.

BELLIN, M.E.; OYARZO, J.N.; HAWKINS, H.E. et al. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *Journal of Animal Science*, v. 76, n. 8, p. 2032-2039, 1998.

BENCHARIF, D.; AMIRAT, L.; ANTON, M. et al. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, v. 70, p. 1478–1488, 2008.

BERGERON, A.; CRÊTE, M-H.; BRINDLE, Y. et al. 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, n. 3, p. 708-717, 2004.

BERNDTSON, W.E.; FOOTE, R.H. The survival of frozen bovine spermatozoa following minimum exposure to glycerol. *Cryobiology*, v. 5, n. 6, p. 398-402, 1969.

BERNDTSON, W.E.; FOOTE, R.H. Bovine sperm cell volume at various intervals after addition of glycerol at 5 °C. *Cryobiology*, v.9, n. 1, p. 29-33, 1972a.

BERNDTSON, W.E.; FOOTE, R.H. The freezability of spermatozoa after minimal

pre-freezing exposure to glycerol or lactose. *Cryobiology*, v. 9, n. 1, p. 57-60, 1972b.

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, n.3, p.1105-1122, 2002.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordisk Veterinaermedicin*, v. 25, n.7-8, p. 383-391, 1973.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B. et al. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, v. 50, n. 5, p. 699-706, 1998.

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.

BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; BAUER, J. E. et al. Cholesterol and phospholipid analysis in sperm of stallions with unexplained subfertility. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS - AAEP, nº 51, 2005, Seattle, USA, *AAEP Proceedings…*, Ithaca NY: IVIS, 7-Dec-2005. Disponível em: http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2005/ brinsko/ chapter. asp? LA=1. Acessado em: 20 abr. 2012.

BUFFONE, M. G.; VERSTRAETEN, S. V.; CALAMERA, J. C.; DONCEL, G. F. High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies. *Journal of Andrology*, v. 30, n. 5, p. 552-558, 2009.

BUSTAMANTE FILHO, I. C. *Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen equino.* 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CBRA – COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.* Belo Horizonte, 1998. 49p.

CELEGHINI, E.C.C. *Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes.* 2005. 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CELEGHINI, E.C.C; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin, *Animal Reproduction Science*, v. 104, n. 2-4, p. 119-131, 2008.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J. et al. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, v. 6, n. 2, artigo n.

43, 2005. Disponível on line em: www.aaps.org. Acessado em 31/10/2006.

CHANG, M. C. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature*, v. 168, p. 697-698, 1951.

CHANG, M.C. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature*, v. 179, n. 4553, p. 258-259, 1957.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 59, p. 451-458, 2001.

CHAVEIRO, A.; LIU, J.; ENGEL, B. et al. Significant variability among bulls in the sperm membrane permeability for water and glycerol: Possible implications for semen freezing protocols for individual males. *Cryobiology*, v. 53, n. 3, p. 349-359, 2006.

CHEN, V.; FOOTE, R.H.; TOBBACK, C. et al. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-tris and whole milk extenders. *Journal of Dairy Science*, v. 76, n.4, p. 1028-1034, 1993.

CHOI, Y-H; TOYODA, Y. Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein-free medium. *Biology of Reproduction,* v. 59, n. 6, p. 1328-1333, 1998.

CHRISTIAN, A. E.; HAYNES, M. P.; PHILLIPS, M. C.et al. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of Lipid Research,* v. 38, n. 11, p. 2264-2272, 1997.

CHRISTENSEN, P.; BOELLING, D.; PEDERSEN, K.M. et al. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and non return rate of dairy bulls. *Journal of Andrology,* v. 26, n. 1, p. 98-106, 2005.

COHEN, M. V. Free radicals in schemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials?. *Ann. Intern. Med.*, v. 111, p. 918-931, 1989.

COLENBRANDER, B.; BROUWERS, J. F. H. M.; NEILD, D. M.; STOUT, T. A. E.; DA SILVA, P.; GADELLA, B. M. Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. *Theriogenology*, v. 58, p. 341-345, 2002.

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

COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; SCHROEDER, F.; BURGHARDT, R.C.; BLANCHARD, T.L. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine sperm after thawing, *J. Reprod. Fertil.* Suppl., v. 56, p. 127–132, 2000.

COOK, W. H.; MARTIN, W. G. Egg lipoproteins. In: TRIA, E.; SCANU, A.M. (Eds.). *Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems*. New York: Academic Press, 1969. p. 579-615.

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.

COTTORELLO, A.C.P. *Criopreservação de sêmen eqüino utilizando associação de etilenoglicol e glicerol.* 2002. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

CRITSER, J.K.; HUSE-BENDA, A.R.; AAKER, D.V. et al. Cryopreservation of human spermatozoa. II. Post-thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertility and Sterility*, v. 47, n. 6, p. 980-984, 1987.

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

CROSS, N. L. Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. *Biology of reproduction*, v. 59, p. 7-11, 1998.

CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, v. 31, n. 1, p. 39-46, 1994.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*, v. 48, n. 5, p. 831-841, 1997.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, v. 14, n. 4, p. 466-470, 1977.

DARSZON, A.; ACEVEDO, J.J.; GALINDO, B.E. et al. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction*, v. 131, p. 977-988, 2006.

DE LEEUW, F.E.; CHEN, H.C.; COLENBRANDER, B. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, v. 27, n. 2, p. 171-183, 1990.

DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, H.G. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v. 30, n. 1, p. 32-34, 1993.

DEVIREDDY, R.V.; SWANLUND, D.J.; BISHOF, J.C. The effect of extracellular ice on the water permeability parameters of mouse sperm plasma membrane during freezing. In: ASME/JSME Joint Thermal Engineering Conference, 5. 1999, San Diego. *Proceedings*... New York: American Society of Mechanical Engineers, 1999. CD-ROM, paper 6205.

DHAMI, A.J.; SAHNI, K.L.; MOHAN, G. Effect of various cooling rates (from 30ºC to 5ºC) and thawing temperatures on the deep-freezing of Bos Taurus and Bos Bubalis semen. *Theriogenology*, v. 38, n. 3, p. 565-574, 1992.

DHAMI, A. J.; SAHNI, K. L. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa. *Theriogenology*, v. 40, n. 6, p. 1269-1280, 1993.

DUMOULIN, J.C.M.; BERGES-JANSSEN, J.M.; PIETERS, M.H. et al. The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. *Fertility and Sterility*, v. 62, n. 4, p. 793-798, 1994.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. (Eds.). *The physiology of reproduction*. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. Cap. 2, p. 29-77.

ENCOR BIOTECHNOLOGY INC. Ammonium Sulfate Calculator. Disponível em: <http://encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>. Acesso em: 23 de abr. de 2012.

ENNEN, B. D.; BERNDTSON, W. E.; MORTIMER, R. G. et al. Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa frozen in .25-ml straws. *Journal of Animal Science*, v. 43, n. 3, p. 651-656, 1976.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectants "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, v. 23, n. 1, p. 1-13, 1986.

FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C. et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, v. 49, n. 4, p. 871-879, 1998.

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.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

FLORMAN, H. M.; DUCIBELLA, T. Fertilization in Mammals. In: Neil, J. D. (Ed). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd ed.* New York: Academic Press, 2006. v. 1, cap 2, p. 55-112.

FOOTE, R.H.; KAPROTH, M.T. Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. *Journal of Dairy Science*, v. 85, n. 2, p. 453-456, 2002.

FORD, W.C.L. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum. Reprod. Update* v. 12, n.3, p. 269–274. 2006.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 49, n. 2, p. 277-284, 1977.

GADELLA, B. M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal Reproduction Science*, v. 107, n. 3-4, p. 229-236, 2008.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M. et al. Capacitation and acrossome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 68, n.3-4, p. 249-265, 2001.

GADELLA, B. M.; TSAI, P.-S.; BOERKE, A.; BREWIS, I. A. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *The International journal of developmental biology*, v. 52, n. 5-6, p. 473-80, 2008.

GADELLA, B. M; VAN GESTEL, R. A. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 307-319, 2004.

GAO, G.Y.; ASHWORTH, E.; WATSON, P.F. et al. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biology of Reproduction*, v. 49, n. 1, p. 112-123, 1993.

GAO, D.Y.; LIU, J.; LIU, C. et al. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*, v. 10, n. 5, p. 1109-1122, 1995.

GAO, D.; MAZUR, P.; CRITSER, J. K. Fundamental cryobiology of mammalian

spermatozoa. In: KAROW, A. M.; CRITSER, J. K. (Eds.) *Reproduction tissue banking:* scientific principles. San Diego: Academic, 1997. p. 263-328.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. (Ed.) *Reprodução Animal*. 7ª ed. Barueri: Manole, 2004. Cap. 7, p. 97-110.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.P.; JOHNSON, L.A. et al. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent attaining and flow cytometric analysis. *Biology of Reproduction*, v. 34, n. 1, p. 127-138, 1986.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa *Reproduction in Domestic Animals*, v. 34, n. 5, p. 399-404, 1999.

GILMORE, J.A.; LIU, J.; GAO, D.Y. et al. Determination of optimal cryoprotectans and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Human Reproduction*, v. 12, n. 1, p. 112-118, 1997.

GONZALEZ, R.A.F. *Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana do espermatozoide e a integridade de membrana do espermatozoide bovino.* 2004. 92f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, v. 68, n. 3-4, p. 239-247, 2001.

GRAHAM, J. K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 12, n.1, p. 119-130, 1996a.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Reproduction and Technology*. v. 12, n. 1, p. 131-145, 1996b.

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 State University, 1995. p. 83-95.

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, n. 1, p. 55-64, 1990.

GRAHAM, E. F.; ERICKSON, W. E.; BAYLEY, N. D. Effect of glycerol equilibration on frozen bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, v. 40, n. 5, p. 510-515, 1957.

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, n. 1, p. 42-52, 1987.

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

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Fertilização e clivagem. In:__. *Reprodução Animal*. São Paulo: Manole, 2004. Cap. 8, p. 111-126.

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U. et al. 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.

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

HARRISON, R.A.P; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.

HAUGLAND, R.P. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 8. ed. Eugene: Molecular Probes Inc., 2001.

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

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v. 53, p. 47–58. 2000a.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, 2000b.

HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biology of Reproduction*, v. 46, n. 6, p. 1086-1094, 1992.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *Journal of Experimental Zoology*, v. 230, n. 3, p. 473-483, 1984.

IDZIOREK, T.; ESTAQUIER, J.; DE BELS, F.; AMEISEN, J. C. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods*. v. 185, n. 2, p. 249-258, 1995.

ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; MONTAG, M. et al. Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online*., v. 10, n.3, p. 350-354, 2005.

IUPAC. Guia IUPAC para a Nomenclatura de Compostos Orgânicos" Tradução Portuguesa na variantes Européia e Brasileira de "A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds - Recomendations 1993", original em inglês Ed. PÂNICO, R.; POWELL, W.H.; RICHER, J-C, 1993.

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry. *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*, 6th ed., Pergamon Press: Oxford, 1979.

IWAMOTO, T.; GAGNON, C. Purification and characterization of a sperm motility inhibitor in human seminal plasma. *Journal of Andrology*, v. 9, n. 6, p. 377-383, 1988.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L. et al. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden.

Theriogenology, v. 52, n. 4, p. 641-658, 1999.

JASKO, D.J.; LITTLE, T.V.; SMITH, K. et al. Objective analysis of stallion sperm motility. *Theriogenology*, v. 30, n. 6, p. 1159-1167, 1988.

JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E. et al. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. Animal Reproduction Science, v. 60-61, p. 471-480, 2000.

JUHÁSZ, J.; NAGY, P.; KULCSÁR, M. et al. Methods for semen and endocrinological evaluation of stallion: a review. *Acta Vetereinaria BRNO*, v.69, n. 4, p. 247-259, 2000.

KAROW, A.M. *Cryobiology 2001 for mammalian embryologists*. Xytex Corporation, 2001. Disponível em: <http://www.xytex.com/Cryobiology>. Acessado em: 10 out 2001.

KATKOV, I. I.; ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E. Et al. Low- and high-temperature vitrification as a new approach to biostabilization of reproductive and progenitor cells. *International Journal of Refrigeration*, v. 29, p. 346–357, 2006.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, v. 49, n. 6, p. 1202-1207, 1993.

KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. Reprod. Dom. Anim., v. 42, p. 63–67, 2007.

KLEIN, U.; GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with β-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry*, v. 34, p. 13784-13793, 1995.

KOLIBIANAKIS, E.M.; TARLATZIS, B.C.; BONTIS, J. et al. Evaluation of Hamilton-Thorn automated semen analysis system. *Archives of Andrology*, v. 28, p. 213-22, 1992.

KUNDU, C.N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P. et al. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology*, v. 40, n. 2, p. 117-125, 2000.

KUPFERSCHMIED, H. Effect of processing mini-straws at room temperature resp. at +5°C on nonreturn rate. Proc. 8th ICAR, 1976; IV, p. 819-821.

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'FLAHERTY, C. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et Biophysica Acta.*, v. 1784, p. 106–115, 2008.

LARSEN, L.; SCHEIKE, T.; JENSEN, T. K. et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reproduction*, v. 15, n. 7, p. 1562-1567, 2000.

LEIBO, S.P.; BRADLEY, L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: GAGNON, C. (Ed.) *The male gamete.* Vienna: Cache River Press, 1999. p. 501-516.

LEITE, T.G. *Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: Efeitos sobre características de motilidade e de*

integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro. 2008. 121 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte.

LEITE, T.G.; VALE FILHO, V.R.; ARRUDA, R.P. et al. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 120, p. 31–38, 2010.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*, v. 67, n. 4, p. 1250-1258, 2002.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 53, n. 1, p. 109-119, 2002.

MANN, T.; WHITE, I. G. Glycerol metabolism by spermatozoa. *Biochemical Journal* , v. 65, n.4, p. 634-639, 1957.

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. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca^{2+} influx. *Biology of Reproduction*, v. 76, p. 660-665, 2007.

MARQUEZ, B.; SUAREZ, S. S. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of Reproduction*, v. 70, p. 1626-1633, 2004.

MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. In: INTERNATIONAL CONGRESS IN ANIMAL REPRODUCTION AND INSEMINATION, 9., 1980, Madrid. *Proceedings*... Madrid: Ed. Garsi, 1980. p. 99-114.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications, *Am J Physiol*. v. 247, p. C125–C142, 1984.

McKINNON, A.O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. *Australian Equine Veterinarian*, v. 14, n. 4, p. 156-175, 1996.

MELO, M.I.V. *Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino*. 1999. 67 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MILLER, W. J.; VANDEMARK, W. L. The influence of glycerol level, various temperature aspects, and certain other factors on the survival of bull spermatozoa at sub-zero temperatures. *J. Dairy Sci.*, v. 37, n. 1, p. 45-51, 1954.

MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology of Reproduction*, v. 42, n. 6, p. 899-915, 1990.

MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J.K. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: Present moment and perspectives to future. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 45 (Suppl. 2), p. 57–66, 2010a.

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

MOCÉ, E.; PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 118, p. 236–247, 2010b.

MOLECULAR PROBES, INC. Membrane Permeability/Dead Cell Apoptosis Kit with YO-PRO-1 and PI for Flow Cytometry (Catalog no. V13243), p. 1-6, 2010 Disponível em: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp13243.pdf>. Acesso em: 06 Maio 2012.

MORRIS, G. J.; ACTON, E.; MURRAY, B. J.; FONSECA, F. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology*, v. 64, p. 71–80, 2012.

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.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, n. 6, p. 1695-1706, 2002.

MOUSTACAS, V.S.; ZAFFALON, F.G.; LAGARES, M.A. et al. Natural, but not lyophilized, low density lypoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, v. 75, p. 300–307, 2011.

MUIÑO, R.; FERNÁNDEZ, M.; PEÑA, A.I. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, n. 3, p. 305-311, 2007.

NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E.K. et al. A triple-stain flow cytometric method to asses plasma and acrossome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology of Reproduction*, v. 68, n. 5, p. 1828-1835, 2003.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage to freezing and thawing. In: MERYMAN, H.T. (Ed.) *Cryobiology*. New York: Academic Press, 1966. p. 179-220.

NAVRATIL, A. M.; BLISS, S. P.; BERGHORN, K. A. et al. Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 31593–31602. 2003.

NEVES, M.M. *Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de gallus domesticus e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino*. 2008. 116p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte.

O'DELL, W.T.; FLIPSE, R.J.; ALMQUIST, J.O. Metabolism of bovine semen III. Uptake and metabolic utilization of glycerol-1-C14 by bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, v. 39, n. 2, p. 214-218, 1956.

O'DELL, G.D.; HURST, V. The effect of glycerol equilibration time on the freezing of bovine spermatozoa in egg yolk-sodium citrate and skim milk semen extenders. *Journal of Dairy Science*, v. 39, n. 8, p. 1156-1160, 1956.

OLIVEIRA, C.H. *Avaliação das características do espermatozoide eqüino*

congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas. 2007. 84 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte.

OLIVEIRA, C.H.; VASCONCELOS, A.B.; SOUZA, F.A. et al. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 118, p. 194–200, 2010.

PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Anim. Sci.*, v. 39, n. 6, p. 1144-1149, 1974.

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

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, v. 29, n.2, p. 255-266, 1992.

PARKS, J.E.; MEACHAM, T.N.; SAACKE, R.G. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. I. Selection of a PIPES-buffered diluent for evaluating the effect of egg yolk lipoproteins on sperm cholesterol and phospholipids. *Biology of Reproduction*, v. 24, n. 2, p. 393-398, 1981.

PHILLIPS, P.H. Preservation of bull semen. *Journal of Biological Chemistry*, v. 130, n. 1, p. 415, 1939.

PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.*, 23, p. 399–404, 1940.

PICKETT, B.W. Seminal extender and cooled semen. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds.) *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 746-754.

PICKETT, B.W.; BERNDTSON, W.E. Principles and techniques of freezing spermatozoa. In: SALISBURY, G.W.; VANDEMARK, N.L.; LODDGE, J.R. (Eds.), *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. San Francisco: WH Freeman and Company, 1978. p. 494-589.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydratation at low temperatures. *Nature*, v. 164, n. 4172, p. 666, 1949.

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

PURDY P.H.; GRAHAM J.K.: Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biol. Reprod.*, v. 71, p. 522–527, 2004b.

QUINN; P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*, v. 22, n. 2, p. 128-146, 1985.

QUINN; P.J. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v.21, n. 1, p. 3-19, 1989.

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, n. 2, 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.

RAJU K.S., MAHADEVAN, S. Isolation of hen's egg yolk very low density lipoproteins by DEAE-cellulose chromatography. *Anal. Biochem*., v.61, p.538-547, 1974.

RAPHAEL, C.F. *Efeito da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide eqüino refrigerado.* 2007. 111f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo.

RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M.; GADELLA, B.M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 462-470, 2001.

ROBERTSON, R.T.; BHALLA, V.K.; WILLIAMS, W.L. Purification and the peptide nature of decapacitation factor. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 45, n. 5, p. 1331-1336, 1971.

SAENGER, W. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. Angewandte Chemie International ed. in English, v. 19, n. 5, p. 344-362, 1980.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 37, n. 3-4, p. 185-249, 1995a.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. *SAS User´s Guide*: statistical analysis system. Release 6.12, Cary, NC: SAS Institute, 1998.

SENGER, P.; BECKER, W.C.; HILLERS, J.K. Effect of thawing and post-thaw temperature on motility and acrossomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws. *Journal of Animal Science*, v. 42, n. 4, p. 932-936, 1976.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.

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

SINGER, S.J., NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes. *Science,* v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972.

SNOECK, P.P.N. *Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade.* 2003. 116 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOUZA, N.L. *Avaliação de técnicas para determiner a viabilidade e a integridade do acrossoma de espermatozoides criopreservados de eqüinos.* 2001. 76 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

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.

SUAREZ, S. Hyperactivated motility in sperm. *Journal of andrology*, v. 17, n. 4, p. 331-335, 1996.

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

SUGKRAROEK, P.; KATES, M.; LEADER, A. et al. Levels of cholesterol and phospholipids in freshly ejaculated sperm and Percoll-gradient-pelleted sperm from fertile and unexplained infertile men. I*nternational Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 37, n. 4, p. 820-827, 1991.

SZTEIN, J.M.; NOBLE, K.; FARLEY, J.S. et al. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, v. 42, n. 1, p. 28-39, 2001.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 62, n. 7, p. 1245-1252, 2004.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipids-binding proteins stimulate phospholipids efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*, v. 61, n. 3, p. 590-598, 1999.

THÉRIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biology of reproduction*, v. 57, n. 5, p. 1080-8, 1997.

TRIMECHE, A.; ANTON, M.; RENARD, P. et al. Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*; v. 34, n. 4, p. 385-393, 1996.

TSUTSUI, T. Functional properties of heat-treated egg yolk low density lipoprotein. *Journal of Food Science***,** v. 53, n. 4, p. 1103-1106, 1988.

TURNER, R.M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction Fertility and Development*, v.18, n. 2, p. 25-38, 2006.

URNER, F.; SAKKAS, D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction*, v. 125, p. 17-26, 2003.

VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J.; SALVADOR, D.F. Melhoramento genético e manejo reprodutivo de touros jovens (CAP/DEP's) na raça Tabapuã : Projeto UFMG/ Núcleo Três Fronteiras. *ABCZ Revista Brasileira do Zebu e seus Cruzamentos*, n. 12, p. 44-47, 2003.

VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M. Membrana plasmática do espermatozoide. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n. 36, p. 45-53, 2001.

VAN WAGTENDONK-DE LEEW, A.M.; HARING, R.M.; KAAL-LANSBERGEN, L.M.T.E. et al. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriogenology*, v. 54, n.1, p. 57-67, 2000.

VERA-MUNOZ, O.; AMIRAT-BRIAND, L.; DIAZ, T. et al. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl® and Bioxcell®. *Theriogenology*, v. 71, p. 895–900, 2009.

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. L.; MOORE, G. D. et al. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*., v.121, p. 1129-1137, 1995.

VISCONTI, P. E.; GALANTINO-HOMMER, H.; MOORE, G. D. et al. The molecular basis of sperm capacitation. *Jounal of Andrology*, v. 19, n. 2, p. 242-248, 1998.

VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 1-6, 1998.

VISCONTI, P. E.; WESTBROOK, V. A.; CHERTIHIN, O. et al. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 53, p. 133-150, 2002.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, v. 62, n. 1-3, p. 23-53, 2000.

WAKAMATU, T.; SATO, Y.; SAITO, Y. Identification of the components responsible for the gelation of egg yolk during freezing. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.46, n. 6, p. 1495-1503, 1982.

WANG, A. W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I.; etal. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*, v. 49, p. 921-925, 1997.

WASS, K.; HEDEBRO-VELANDER, I.; SWENSSON, T. Effects of different extenders and processing techniques on the non-return rate of deep frozen bull semen. Proc. 9th ICAR, 1980; V, p. 366-370.

WATSON, P.F: The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G.J.; CLARK, A. (eds) *Effects of low temperatures on biological membranes.* London: Academic Press, 1981a, p. 189–218.

WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 62, n. 2, p. 483-492, 1981b.

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, n. 4, p. 871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WATSON, P.F.; DUNCAN, A.E. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*, v. 25, n. 2, p. 131-142, 1988.

WATSON, P.F.; MARTIN, C.A. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5ºC. *Australian Journal of Biological Science*, v. 28, p. 145–152, 1975.

WAY, A.L.; GRIEL Jr., L.C.; KILLIAN, G.J. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *Journal of Andrology*, v. 21, n.2, p. 213-219, 2000.

WERTHEIMER, E. V.; SALICIONI, A. M.; WEIMIN, L. et al. 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.

WHITE, I.G. The effect of some inorganics ions on mammalian spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 3., 1956, Cambridge. *Proceedings...*, v. 1, p. 23-25, 1956.

WILLET, E.L.; SALISBURY, G.W. The effect of various diluters, cooling rate, temperature of storage, and some other factors on the livability of spermatozoa in stored samples of bull semen. *Cornell University Agricultural Experiment Station Memoir*, v. 249, p. 45, 1942.

YANCEY, P. G.; RODRIGUESA, W. V.; KILSDONK, E. P. C. et al. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins: Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 27, p. 16026-16034, 1996.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. eds. *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press, 1994. p. 189-317.

ZAFFALON, F. G. *Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja*. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabela 22 - Composição dos meios diluidores para criopreservação de sêmen bovino com e sem Ciclodextrina Carregadas com Colesterol (CLC).

	Diluidores				
	1	**2**	**3**	**4**	
Ingredientes	**Controle** (Tris-gema)	**LDL**	**LDL +CLC**	**L-CLC**	Conc. Molar
Tris (g)	2,42	2,42	2,42	2,42	200 mM
Ácido cítrico (g)	1,36	1,36	1,36	1,36	70,7 mM
Frutose (g)	1,0	1,0	1,0	1,0	55,5 mM
Penicilina G potássica (g)	0,028	0,028	0,028	0,028	0,75 mM
Estreptomicina (g)	0,0067	0,0067	0,0067	0,0067	46 μM
Gema de ovo (mL)	20	-	-	-	
LDL (%, MS) (g)*	-	8% (20,25g)	8% (20,25g)	0,8% (2,02g)	
Glicerol (mL)	6	6	6	6	822 mM
CLC (Pré-tratamento)[1]	-	-	+	+	
H_2O destilada (q.s.p.)	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	
pH	6,5	6,5	6,5	6,5	
Osmolaridade (mOsm/Kg H_2O)	1529	1443	1443	1361	

* - gramas de Matéria natural, MS do LDL = 39.5%; [1]- adição de 1,5 mg de CLC/ 120 x10^6 sptz/mL e incubação a 32°C por 15 min antes da adição do diluidor de criopreservação (Pré-tratamento).

(*) q.s.p. – quantidade suficiente para.
Densidade do Glicerol : 1,2613 g/cm3

Obs1: O meio Tris 300 mOsm (200 mM Tris, 71 mM ácido cítrico, 55 mM Frutose, pH=7,4; 300 mOsm), apresenta a mesma composição básica dos demais diluidores, incluindo **antibióticos**, porém não possui nenhuma fonte de lipoproteínas, e sem glicerol na sua composição. A sua osmolaridade foi ajustada em 300 mOsm com a adição de 0,0643 g de NaCl/100 mL de solução.

Obs2: O preparo do diluidor deve ser feito em uma proveta graduada (1L) sob agitação magnética. Durante o preparado dos meios diluidores, deve-se sempre realizar a adição na sequência de todos os sais, em um pouco de dd. H_2O (água destilada deionizada), sob agitação e então ajustar o pH do meio antes da adição das lipoproteínas ou da gema de ovo. O ajuste do pH pode ser feito com solução de NaOH 1N. **Atenção**: O ajuste do pH depois da adição da fonte de lipoproteínas pode leva a precipitação destas, o que é prejudicial. O último reagente a ser acrescentado é o glicerol, portanto deve-se deixar um espaço para a sua adição e completar a solução com água destilada deionizada. Os diluidores devem ser congelados até o momento do uso (–20°C).

Cálculo da quantidade de LDL em MN (Matéria natural):

Após a determinação da quantidade de matéria seca da amostra de LDL purificado procede-se o cálculo da quantidade de LDL em matéria natural a ser acrescentado para se obter 8% de LDL (em Matéria Seca) no diluidor.

Exemplo:

Amostra de LDL – Teor de MS (Matéria Seca) = 39%

Então temos :

No LDL: MS MN de LDL

em

39 g ----------→ 100g

8g ----------→ X g

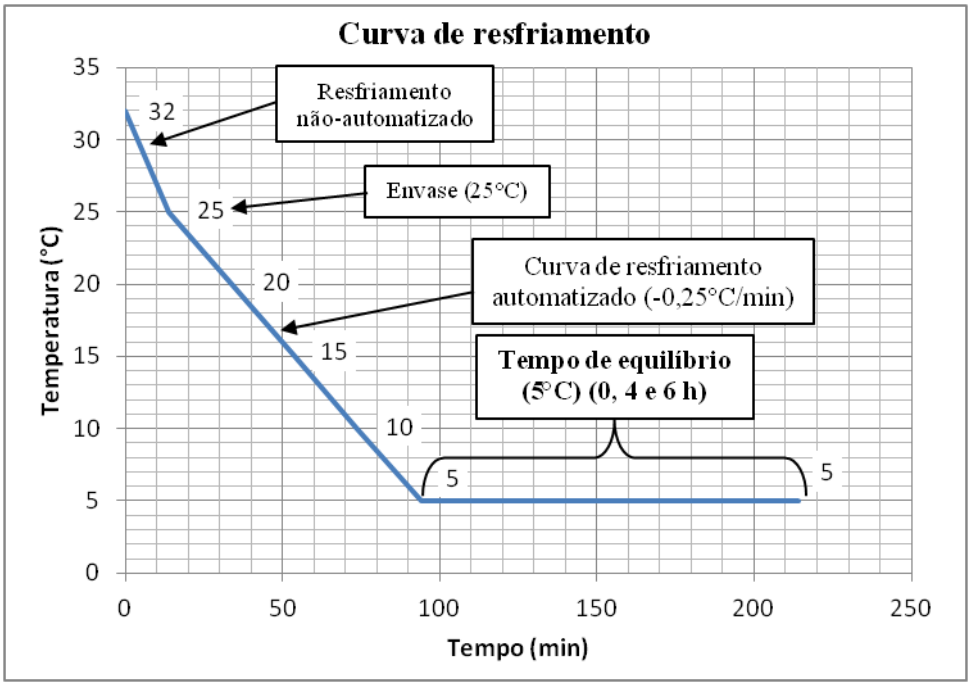
Então: X = 800 / 39

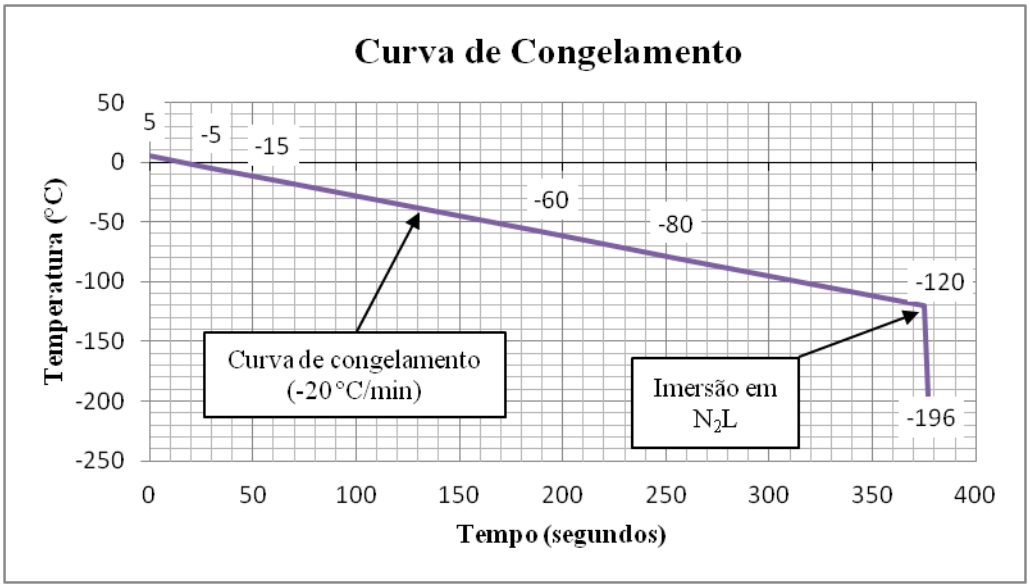
X = 20, 51g de MN de LDL

- Então para preparar 100 mL de um meio diluidor contendo 8% (MS) de LDL devemos adicionar durante o preparo 20, 51 g de LDL (em MN) purificado pelo método de Moussa et al. (2002).

ANEXO 2

Curvas de Resfriamento e de Congelamento utilizadas no experimento





ANEXO - 3

SETUP-HAMILTON THORNE RESEARCH (Ultimate – Sperm Analyzer)

CARACTERÍSTICA	**AJUSTE**
Número de imagens adquiridas	30
Taxa de aquisição das imagens	60 Hz
Contraste mínimo da célula	50
Tamanho mínimo da célula	6 pixels
Contraste para células imóveis	30
Retilinearidade (STR), Limiar	60%
Valor de corte de VAP para células lentas	30,0 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
Freqüência de vídeo	60
Intensidade de iluminação	2203
Temperatura	37º C

ANEXO 4

<u>TALP SPERM MODIFICADO</u> (Andrade, 2009).

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

Componentes:

- NaCl..... 2,100 g
- KCl ..... 0,935 g
- NaH_2PO_4..... 0,025 g
- MgCl 6.H_2O..... 0,040 g
- Hepes …….... 3,250 g - (Sigma-Aldrich, cod. H4034)

Preparo:

- Diluir MgCl 6H_2O em 200 mL de água destilada
- Diluir os outros sais em 200 mL de água destilada
- Combinar as duas soluções e completar para 500mL em balão volumetrico
- Manter resfriado (5°C)

2. SOLUÇÃO DOS METABÓLITOS GLICOSADOS

2.1 - SOLUÇÃO ESTOQUE (para preparar 50 mL)

Componentes

- Glicose ..... 2,50 g
- Lactato de Sódio ..... 9,25 mL - (Sigma Aldrich, cod. L 1375)
- Piruvato de Sódio ..... 70 mg
- Pen-Strep®..... 12,5 mL - (Sigma-Aldrich, cod. P4333)

Preparo :

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

2.2- SOLUÇÃO TRABALHO (metabólitos glicosados)

Preparo:

- Colocar 45 mL da Solução de Sais do TALP
- Colocar 5 mL da Solução Estoque dos Metabólitos Glicosados
- Ajustar pH 7,4
- Aliquotar (alíquotas de 250 µL)
- Manter em freezer (-20º C)

3. TALP SPERM MODIFICADO (preparo do dia)

Componentes:

- 10 mL da Solução de Sais do TALP
- 200 µL da Solução (trabalho) de Metabólitos Glicosados

Preparo:

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

ANEXO 5

DILUIÇÕES E PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

1. IODETO DE PROPÍDIO (PI, Sigma-Aldrich, cod. P4170 – 25 mg)

- SOLUÇÃO ESTOQUE (25 mg/mL)
  - 25 mg de PI + 1 mL de DMSO
  - Armazenar em freezer (-20°C), no escuro.

  * Obs: DMSO – (Sigma-Aldrich, Cod. D.4540-100 mL)

- SOLUÇÃO TRABALHO (0,5 mg/mL)
  - 20 µL da solução estoque de IP (25mg/mL) + 980 µL de DPBS
  - Armazenar em freezer (-20°C), no escuro.

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

- SOLUÇÃO TRABALHO (100 µg/mL)
  - 2 mg de FITC-PSA + 20 mL de DPBS
  - Aliquotar (10 µL) e Armazenar a 4º C, no escuro

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

- SOLUÇÃO ESTOQUE (DMSO) – (25mg/mL)
  - 100 mg de H342 + 4 mL de DMSO

- SOLUÇÃO TRABALHO (DPBS) – (5 mg/mL)
  - 400 µL da solução estoque 100 mg (25 mg/mL) + 1600 µL de DPBS
  - Aliquotar em 10 µL e armazenar em freezer (-20°C), no escuro.

4. MEROCIANINA 540 (Sigma-Aldrich, cod. 323756 – 100 mg)

*PM: 569,67 (Peso Molecular)

- SOLUÇÃO ESTOQUE (DMSO) – 5 mM
  - 25 mg de Merocianina 540 + 8,777 mL de DMSO

- SOLUÇÃO TRABALHO (DMSO) – 810 µM
  - 32,4 µL da solução estoque (5 mM) + 167,6 µL de DMSO
  - Quatidade suficiente para avaliar 400 amostras
  - Aliquotar em microtubos com 10 µL (20 análises)
  - Armazenar em freezer (-20°C), no escuro.

5. YO-PRO-1 (491/509) (Molecular Probes, cod. Y3603 – 1 mL)

- SOLUÇÃO ESTOQUE (DMSO) – 1mM
  - Solução pronta para uso (obs: 1 mM = 1000 µM)

- SOLUÇÃO TRABALHO (DMSO) – 7,5 µM
  - 1,5 µL da solução estoque (1000 µM) + 198,5 µL de DMSO
  - Quatidade suficiente para avaliar 400 amostras
  - Aliquotar em tubos com 10 µL (20 análises)
  - Armazenar em freezer (-20°C), no escuro.

6. C11-BODIPY $^{581/591}$ (Molecular Probes, cod. D3861 – 1 mg)
*PM = 504,43 (Peso Molecular)

- SOLUÇÃO TRABALHO (DMSO) – 2 mM
  - 1 mg de C11-BODIPY$^{581/591}$ + 1 mL de DMSO
  - Aliquotar em microtubos com 10 µL (20 análises) e vedar com Parafilm®.
  - Armazenar em freezer (-20°C), no escuro.

- Indutor de peroxidação (compensação do C11-BODIPY na citometria)
  - Solução a 64 mM de sulfato ferroso (17,79 mg de $FeSO_4$ em 1 mL)
  - Adicionar 5 µL da solução de sulfato ferroso em 495 µL da amostra (na conc de $5x10^6$ sptz/mL). Incubar por 10 min. Adicionar 0,5 µL de BODIPY (2 mM) para atingir uma concentração final de 2 µM e incubar por 30 min a 37°C. Retirar uma aliquota de 145 µL e adicionar 2 µL de H342 + 3 µL de PI incubando novamente por 10 min. a 37°C. Diluir a amostra com 150 µL de TALPm e realizar a leitura no citômetro.

ANEXO - 6

Morfologia espermática do sêmen fresco pré- diluição e criopreservação

Espermiograma segundo Blom (1973).

Espermiograma	**Morfologia Espermática pré-criopreservação**														
Fazenda: ABS Pecplan	**Local: Central de Inseminação Artificial da ABS Pecplan - Uberaba - Minas Gerais**									**Raça: Nelore**			Data: 28/10/2011		
Nº Touro (identificação)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ASPECTOS MORFOLÓGICOS															
DEFEITOS MAIORES (%)	**9%**	**9%**	**7%**	**8%**	**8%**	**9%**	**9%**	**9%**	**8%**	**7%**	**7%**	**9%**	**9%**	**6%**	**6%**
Acrossoma	2	3		3	3	2	2	2			2	2	3		
Gota Cit. Proximal (GCP)		2		2	2		2	2	2	1		3	2	2	2
Subdesenvolvido															1
Cabeça Isol. Patológica															
Delgado na Base	3	1		1		3	2								
Pirriforme	2	2	2	2	2	1		2	2	2			3		
Pequena Anormal															
Contorno Anormal			2		1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	3
Pouch Format. (diadema)															
Teratológica (form. duplas)															
Peça Intermediária (PI)	2	1	3			2	2	1	2	2	3	2		2	
Cau. Fort. Dob./Enr.															
Cauda Enr. Cabeça															
Outros															
DEFEITOS MENORES (%)	**8%**	**1%**	**3%**	**2%**	**3%**	**3%**	**5%**	**4%**	**3%**	**11%**	**7%**	**7%**	**2%**	**6%**	**4%**
Gota Cit. Distal (GCD)	3		2			2	2			2	2	2	2		
Cabeça Delgada															
GCLP (perda menb. acr)		1	1												
Cabeça Isol. Normal	3				2		3	2	3	3	3	2		3	2
Abax./Retro./Obliq.															
Cauda Dob./Enr.	2			2	1	1		2		6	2	3		3	2
TOTAL DEFEITOS (%)	**17%**	**10%**	**10%**	**10%**	**11%**	**12%**	**14%**	**13%**	**11%**	**18%**	**14%**	**16%**	**11%**	**12%**	**10%**
ASPECTOS FÍSICOS															
Volume	11,3 mL	9,6 mL	4,9 mL	5,3 mL	3,6 mL	7 mL	5,2 mL	7,2 mL	4,1 mL	5,11 mL	7,6 mL	9,7 mL	9,8 mL	5,5 mL	7,7 mL
Motilidade de massa (1-5)	5	4	5	5	5	4	5	5	5	5	4	5	4	5	5
Motilidade Total (%)	75	80	70	80	80	75	75	75	80	80	80	80	80	80	80
Vigor (1-5)	5	4	5	4	5	5	5	4	5	4	4	5	4	4	4
CONCENTRAÇÃO (x 10^6/ ml)	1243	812	1265	1203	1460	622 mL	1245	975	982	1449	599	1126	562	912	946
Medidas															
Circunferência Escrotal (CE) cm	47	40	34	42	43	44	43	46	40	51	40	48	42	40	41

ANEXO 7
Fotos do experimento



Figura 23 – Fotos de animais da raça Nelore pertencentes ao plantel da Central de Inseminação Artificial ABS Pecplan que foram utilizados no experimento. Uberaba, MG – 2011.



Figura 24 – Método de coleta por vagina artificial como utilizado na rotina da Central de Inseminação Artificial ABS Pecplan. Uberaba, MG – 2011.



Figura 25 – Entrega do sêmen após a coleta para o laboratório de processamento de sêmen através de janela de amostras própria, minimizando os riscos de contaminação. Uberaba, MG – 2011.

Fotos dos procedimentos e equipamentos utilizados:



Figura 26 – Após o recebimento da amostra procedeu-se a análise da concentração espermática das amostras utilizando um espectrofotômetro com diluidor automático de sêmen (Accucell® bovine photometer, Modelo n° 704, IMV Technologies). Laboratório da ABS Pecplan, Uberaba, MG – 2011



Figura 27 – Equipamentos e técnicos do laboratório da Central de Inseminação Artificial Pecplan ABS que auxiliaram na realização do experimento.



Figura 28 – Fotos dos equipamentos utilizados para a criopreservação do sêmen, em detalhe Máquina de congelamento automatizado (modelo TK-3000® compacta).



Figura 29 – Métodos de envase manual das palhetas e avaliação da motilidade visual por meio de microscópio de contraste de fases (avaliação pré e pós-criopreservação).

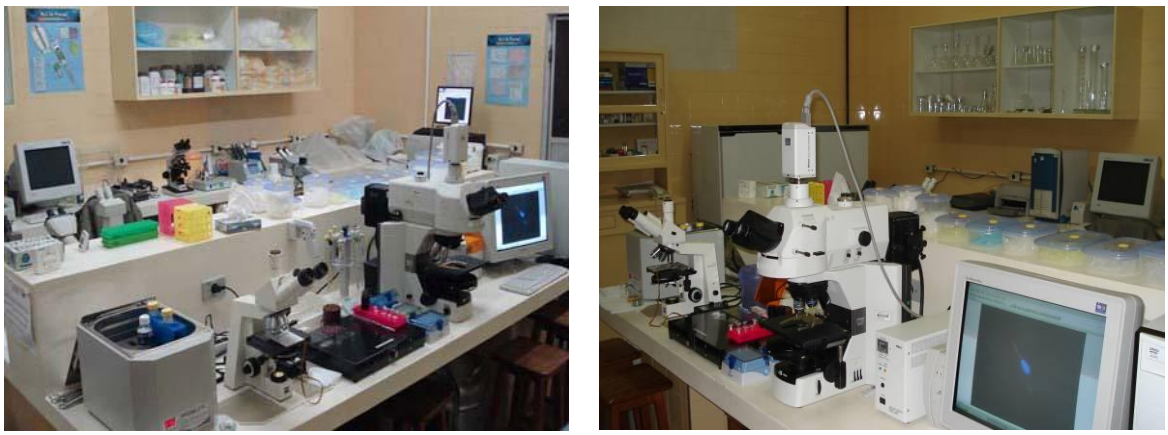


Figura 30 – Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - FMVZ-USP Campus de Pirassununga - SP



Figura 31 – Fotos do aparelho IVOS (Versão 12.3, Hamilton-Thorne Research) e de colaboradores do experimento. Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - FMVZ-USP Campus de Pirassununga – SP.

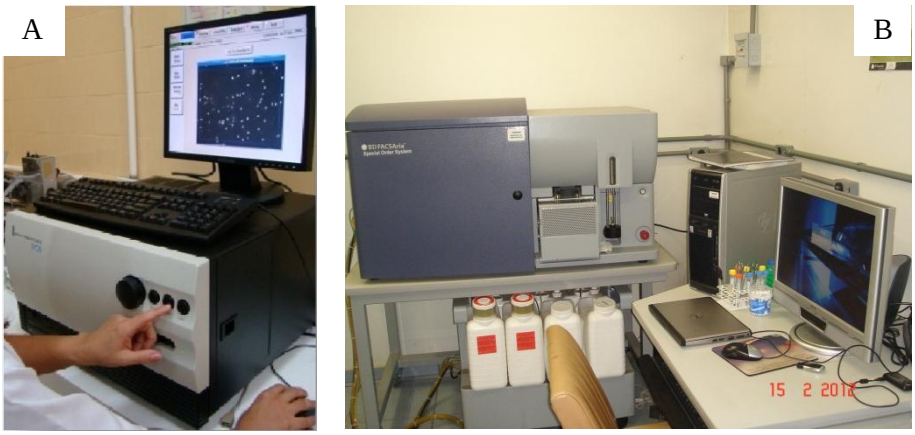


Figura 32 – Fotos dos equipamentos utilizados nas análises pós-descongelamento. (A) Aparelho de análise computadorizada de sêmen IVOS (Versão 12.3, Hamilton-Thorne Research). (B) Citômetro de fluxo FACSaria (Becktson-Dickeson®, Sunnyvale, CA, USA)



Figura 33 – Detalhes do Citômetro de fluxo FACSaria (Becktson-Dickeson®, Sunnyvale, CA, USA). FMVZ-USP Campus de Pirassununga – SP.