

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Hariany Seabra Martins

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO EM DILUIDORES CONTENDO OS
ANTIOXIDANTES LACTOFERRINA E CATALASE.**

Belo Horizonte
2015

Hariany Seabra Martins

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO EM DILUIDORES CONTENDO OS
ANTIOXIDANTES LACTOFERRINA E CATALASE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.
Orientadora: Prof^ª Monique de Albuquerque Lagares

Belo Horizonte
2015

M386c Martins, Hariany Seabra, 1990-
Criopreservação de sêmen equino em diluidores contendo os antioxidantes lactoferrina e catalase / Hariany Seabra Martins. – 2015.
70 f. : il.

Orientadora: Monique de Albuquerque Lagares
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Equino – Reprodução – Teses. 2. Sêmen – Criopreservação – Teses. 3. Sêmen – Fertilidade – Teses. 4. Espermatozóides – Teses. 5. Antioxidantes – Teses. I. Lagares, Monique de Albuquerque. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 926

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.

FOLHA DE APROVAÇÃO

HARIANY SEABRA MARTINS

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Reprodução Animal.

Aprovada em 26 de março de 2015, pela banca constituída pelos membros:

Monique de Albuquerque Lagares

Prof^a. Monique de Albuquerque Lagares
Presidente - Orientador

Rodrigo Costa Mattos

Prof. Rodrigo Costa Mattos
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

FRCA Almeida

Prof^a. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu amigo mais fiel, que me proporcionou todas as oportunidades e alegrias que tive até hoje e me amparou nos momentos mais difíceis.

A minha mãe Clemilda, minha guerreira e fonte de inspiração, por acreditar em mim em todos os momentos.

Ao meu irmão Hernane, por ser o *brother* mais camarada do planeta e o meu “chapa” de todas as horas.

Ao meu pai José, que mesmo não estando mais fisicamente presente, esteve comigo em todos os momentos como o meu anjo da guarda.

A toda minha família, que sempre me apoiou e me fez ser quem sou hoje.

A minha orientadora Profa. Monique, por ser muito mais que uma professora, uma verdadeira “mãezona” em todos estes anos de graduação e pós-graduação.

A minhas amigas-irmãs Isabela, Joana e Vanessa, por significarem para mim o mais profundo e amplo sentido que se possa dar a palavra amizade.

Aos meus amigos Amanda, Augusto, Carlitos, Filipe, Isabela Lanza, Juliana, parceiros de todas as horas e sempre diversão garantida.

Aos colegas do setor de reprodução Beatriz, Cíntia, Clarice, Dimitre, Flávia, Natália pela ajuda e cumplicidade em todos os momentos de nossos árduos projetos.

Aos colegas da Unidade Técnica Local de Agricultura/Caratinga- MAPA, que me deram apoio essencial no fim desta jornada.

À banca examinadora, Professor Rodrigo Costa Mattos, UFRGS e Professora Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, UFMG.

Ao técnico Danilo Bastos do Depto. de Zootecnia da Escola de Veterinária pelas sugestões e execução das análises estatísticas.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho e ao pesquisador Márcio Sobreira, do Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ Minas, pelo auxílio nas análises no citômetro de fluxo.

Ao Prof. Francisco Carlos Faria Lobato por disponibilizar o uso do microscópio de fluorescência e a técnica Grazielle Cossenzo Florentino Galinari do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, por sua ajuda e solicitude em todos os momentos para aquisição das fotos no microscópio.

Ao Prof. Steyner de França Côrtes e a Dra. Grazielle Carolina da Silva do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG pela dosagem dos radicais livres e pela disponibilidade de sempre.

A Profa. Fabíola Paes Leme pela disponibilidade do Laboratório de Patologia Clínica da EV/UFMG e dosagem do Ferro das amostras de sêmen.

Ao Prof. Marc R. J. M. Henry do DCCV/ EV/ UFMG pela disponibilidade do CASA e a Mr. Mayara Brito pela avaliação das amostras de sêmen.

A todos os proprietários de garanhões e aos médicos veterinários dos haras que disponibilizaram os animais para fazerem parte deste experimento.

Aos professores do Setor de Reprodução da Escola de Veterinária pelos valiosos ensinamentos.

Aos equinos, os seres mais incríveis com os quais se é possível trabalhar.

A todos que contribuíram de alguma maneira para que este trabalho fosse realizado.

“Você pode levar um cavalo para a água, mas não pode fazê-lo beber.”

Anônimo

“Você pode levar um homem ao conhecimento, mas não pode fazê-lo pensar.”

Jerri Shinnaman

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi melhorar a qualidade do espermatozoide criopreservado equino com a adição de lactoferrina (Lf) e catalase (Cat) a um diluidor de congelamento de sêmen e avaliar a capacidade fecundante. O sêmen foi congelado com os diluidores: C1) Controle, INRA 82; C2) C1 + 500µg/mL Lf, e C3) C1 + 200 UI/mL Cat. Foram avaliados espermatozoides quanto a motilidade computadorizada (CASA), funcionalidade e integridade de membrana espermática, reação acrossômica espontânea, concentração de Ferro e espécies reativas ao oxigênio. Para avaliar a capacidade fecundante, os espermatozoides foram submetidos aos protocolos de capacitação e hiperativação (H2 e H3) : H1) Controle: meio Whitten's capacitante, H2) H1 + 5mM Procaína, H3) H1 + 5µM Calcio Ionóforo A23187 (CaI). Estes foram analisados quanto à motilidade (CASA), taxa de reação acrossômica, de integridade de membrana espermática, e ligação espermática a zona pelúcida (ZP) de oócito bovino. A concentração de Fe livre foi menor e a taxa de espermatozoides com membrana funcional foi maior no grupo com Lf comparado ao controle ($P < 0.05$). O número de espermatozoides ligados a ZP bovina não diferiu entre o grupo hiperativado com Procaína e o capacitado com o meio de Whitten's, no entanto, foi inferior no grupo hiperativado com o CaI. Concluiu-se que a adição de Lf foi benéfica à qualidade do sêmen criopreservado enquanto o CaI foi prejudicial a ligação do espermatozoide a ZP.

Palavras-chave: espermatozóide; procaína; hiperativação; cálcio; ionóforo.

ABSTRACT

The objective of this study was to improve frozen sperm quality with the addition of lactoferrin (Lf) and catalase (Cat) to an equine semen freezing extender and evaluate the in vitro fertilizing ability. Semen was frozen with the extenders: C1) Control INRA 82, C2) C1 + 500µg/mL Lf, and C3) C1 + 200 IU/mL Cat. Sperm motility characteristics, membrane integrity and functionality, spontaneous acrosome reaction, iron and reactive oxygen species concentrations were evaluated. To estimate the in vitro fertilizing ability, the sperm were submitted to the capacitation and hyperactivation (H2 and H3) protocols: H1) Control: modified Whitten's capacitation medium, H2) H1+Procaine 5mM, H3) H1+Calcium Ionophore A23187 5µM (CaI). Sperm motility (CASA), acrosome reaction and membrane integrity rates were analysed and bovine sperm zona pellucida (ZP) binding assay performed. The iron concentration was lower and membrane functionality was higher in the Lf treated sperm compared to the control group ($P<0.05$). The number of bovine ZP sperm binded did not differ between the capacitated with Whitten's medium and Procaine hiperactivated sperm, however, it was lower in the CaI hiperactivated group. It was concluded that the addition of Lf was beneficial to the frozen equine semen quality while CaI was detrimental to the ZP sperm binding.

Keywords: sperm; procaine; hyperactivation; calcium; ionophore.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia do espermatozóide equino.	15
Figura 2. Organização da membrana plasmática; modelo “mosaico fluido”.	17
Figura 3. Adesão de proteínas do plasma seminal à membrana plasmática (decapitação espermática); Espermatozóide capacitado nos fluidos do trato feminino.	18
Figura 4. Sequência da capacitação espermática.....	20
Figura 5. Sequência da reação acrossômica..	21
Figura 6. Representação esquemática das mudanças físicas no espermatozóide equino durante o congelamento.....	24
Figura 7. Representação das causas e consequências do estresse oxidativo na célula espermática.	28
Figura 8. Esquema representativo do protocolo de preparação do sêmen para as análises no CASA, citômetro de fluxo e para o ensaio de ligação espermática à Zona Pelúcida pelo <i>Zona Binding Assay</i> (ZBA).	41
Figura 9. Planos de análise computadorizada do semen (CASA)..	49
Figura 10. Fotomicrografia mostrando os espermatozóides equinos ligados a zona pelúcida bovina.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características de avaliação do sêmen fresco.....	43
Tabela 2. Percentual espermatozoides com motilidade total, progressiva e vigor após diluição do sêmen fresco (mediana; mínimo-máximo).....	44
Tabela 3. Parâmetros espermáticos avaliados pelo CASA pós-descongelamento (média± desvio padrão), e amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) do espermatozoide (mediana; mínimo-máximo).....	44
Tabela 4. Percentual de espermatozoides com membranas íntegras (IP negativo, citometria de fluxo), funcionais (teste hiposmótico), com reação acrossômica (IP negativo e PNA positivo, citometria de fluxo) pós-descongelamento, e número de espermatozoides ligados a ZP bovina. (média± desvio padrão).....	45
Tabela 5. Concentrações de ferro, nitrito e peróxido de hidrogênio no sêmen pós-descongelamento (média± desvio padrão).....	45
Tabela 6. Parâmetros de motilidades dos espermatozoides avaliados com o CASA após os protocolos de capacitação e hiperativação (média±desvio padrão).....	46
Tabela 7. Porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra (IP-) e com acrossoma reagido (RA+, PNA+/IP-) avaliados por citometria de fluxo, e número de espermatozoides ligados à zona pelúcida (ZBA) após os protocolos de capacitação e hiperativação (média±desvio padrão).....	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1. Morfologia espermática.....	14
3.2. Membrana espermática.....	16
3.3. Capacitação espermática.....	17
3.4. Hiperativação.....	21
3.5. Princípios da criopreservação do sêmen.....	23
3.6. Processo de criopreservação do semen.....	25
3.7. Estresse oxidativo.....	28
3.8. Peroxidação lipídica.....	30
3.9. Métodos de avaliação espermática <i>in vitro</i>	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Coleta de sêmen.....	35
4.2 Avaliação do sêmen fresco.....	35
4.3 Parte 1. Avaliação da qualidade espermática pós-descongelamento com diferentes diluidores contendo antioxidantes.....	36
4.3.1 Congelamento de sêmen.....	36
4.3.2 Avaliação espermática pós-descongelamento.....	36
4.3.3 Análise da motilidade espermática computadorizada (CASA).....	36
4.3.4 Avaliação da funcionalidade espermática.....	36
4.3.5 Avaliação da integridade de membranas espermáticas.....	37
4.3.6 Mensuração da concentração de espécies reativas ao oxigênio.....	37
4.3.7 Mensuração da concentração de ferro livre.....	38

4.4	Parte 2: Avaliação da capacidade fecundante do espermatozoide equino submetido a diferentes protocolos de capacitação e hiperativação.....	38
4.4.1	Seleção espermática e indução da hiperativação.....	38
4.4.2	Análise dos parâmetros de motilidade com o sistema de avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA) após indução da capacitação/hiperativação.....	38
4.4.3	Análise da integridade de membranas espermáticas e reação acrossômica após indução da capacitação/hiperativação.....	39
4.4.4	Preparação de oócitos para o ensaio de ligação à zona pelúcida bovina.....	39
4.4.5	Preparação do sêmen para o ensaio de ligação espermática à zona pelúcida (ZBA) bovina.....	39
4.4.6	Ensaio de ligação de espermatozoides equinos à zona pelúcida de oócito (ZBA) bovino.....	40
4.5	Análises estatísticas.....	42
5.	RESULTADOS.....	43
5.1	Parte1: Avaliação da qualidade espermática pós-descongelamento com diferentes diluidores contendo antioxidantes.....	43
5.2	Parte2: Avaliação da capacidade fecundante do espermatozoide equino submetido a diferentes protocolos de capacitação e hiperativação.....	45
5.3	Características de motilidade espermática como indicação de hiperativação.....	46
5.4	Avaliação da integridade de membrana espermática, reação acrossômica e ligação à zona pelúcida.....	46
6.	DISCUSSÃO.....	48
7.	CONCLUSÕES.....	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
	ANEXOS.....	65

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de gametas sempre foi vista com especial atenção pelo seu potencial na preservação, disseminação e melhoramento do material genético animal. Na espécie equina, o processo de criopreservação do sêmen permite o armazenamento das células espermáticas por um longo período de tempo contribuindo para a comercialização do sêmen independentemente do tempo de transporte e do local onde estão o garanhão e a égua, e para a preservação do sêmen de animais de alto valor zootécnico. Contudo, com exceção de algumas espécies (como a bovina), o sêmen congelado vem sendo sinônimo de redução da fertilidade. Este tipo de processamento gera diversos danos aos espermatozóides, os quais por sua vez comprometem a viabilidade, a motilidade e funções fisiológicas mais complexas dentro da célula (Roca et al, 2013).

Durante a criopreservação, o espermatozóide sofre um aumento da concentração do cálcio intracelular, aumento da formação de espécies reativas a oxigênio (ROS), e uma redução do potencial antioxidante, devido à remoção do plasma seminal rotineira ao procedimento. Estes fatores podem levar a uma capacitação prematura do espermatozóide com uma conseqüente redução da longevidade da célula criopreservada. Esta “criocapacitação” resulta em mudanças similares, na membrana espermática àquelas detectadas durante a capacitação *in vitro* (Ball, 2008).

Como compensação às perdas com o processo de criopreservação, muitas vezes tem se recorrido a técnicas como o aumento do número de espermatozoides na dose inseminante, inseminação próxima à junção útero-tubárica e inclusive deposição do sêmen cirurgicamente na tuba uterina (Watson, 2000). Isto pode ser explicado pela necessidade de se haver um número suficiente de espermatozoides competentes e capazes de realizar a fertilização no período em que a ovulação está mais propensa a ocorrer.

Uma alternativa a estas técnicas é a produção *in vitro* de embriões, que permite um aumento da eficiência reprodutiva em espécies de alto valor genético e comercial. Na reprodução assistida na espécie equina vem se utilizando técnicas tais como a transferência de embriões, a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) e a transferência nuclear, ainda que as mesmas apresentem baixa eficiência. Todavia, a fertilização *in vitro* (FIV) permanece uma incógnita na espécie, apesar de décadas de trabalhos que tratam deste tema. Apenas dois potros nasceram a partir da técnica, na França (Palmer et al, 1991; Bézard, 1992), sendo que tal resultado não foi repetido, nem pelo mesmo laboratório. As razões para as baixas taxas de fertilização *in vitro*, que se situam entre 0% e 33% (Dell’Aquila et al., 1996, 1997a,b; Alm et al., 2001; Hinrichs et al., 2002) provavelmente devem-se as dificuldades encontradas para uma adequada indução da capacitação *in vitro* do espermatozoide equino. Tal suposição é baseada no insucesso da FIV tanto com oócitos maturados *in vitro* quanto *in vivo* (Palmer et al, 1991). Além disso, foram demonstradas taxas de fertilização comparáveis às de monta natural quando oócitos maturados *in vitro* foram transferidos para a tuba uterina de éguas posteriormente inseminadas (Hinrichs et al, 2002).

Dentre as modificações pelas quais o espermatozoide é submetido durante sua capacitação, o processo de hiperativação mostra-se crucial. Graças a ele, o espermatozoide pode se soltar da parede da tuba uterina, atravessar o lúmen e penetrar na zona pelúcida do oócito (Ho e Suarez, 2001). O influxo de cálcio intracelular no espermatozoide através de canais de cálcio tem sido

descrito como o principal requerimento para a ocorrência da hiperativação (Sanchez-Gutierrez et al., 2006). No entanto, a forma ideal para realizar e avaliar a indução da hiperativação do espermatozoide equino *in vitro* ainda não foi encontrada (McPartlin et al, 2009). No sêmen criopreservado, danos gerados pelo estresse oxidativo como a peroxidação dos ácidos graxos insaturados presentes na membrana plasmática, podem fazer com que a membrana plasmática perca sua responsividade aos sinais gerados pelo influxo de cálcio, inviabilizando assim a hiperativação.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- avaliar o efeito da adição dos antioxidantes Lactoferrina e Catalase ao diluidor de congelamento INRA 82 sobre a qualidade do espermatozói de equino criopreservado.
- avaliar o efeito do diluidor de sêmen com os diferentes antioxidantes sobre a taxa de capacitação e hiperativação espermática induzidas *in vitro* e de ligação a zona pelúcida bovina.
- avaliar a ação dos indutores procaína e cálcio ionóforo na capacitação e hiperativação espermática, e de ligação a zona pelúcida bovina visando o desenvolvimento de protocolos de fertilização *in vitro* na espécie equina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Morfologia espermática

O espermatozoide equino é uma célula altamente especializada com comprimento total de aproximadamente 60-65µm que se divide em cabeça, colo e cauda (Meyers, 2009). A cabeça é achatada, possuindo forma de pá e consiste de acrossoma e núcleo revestidos pela membrana plasmática. O acrossoma foi descrito primeiramente por Waldeyer (1887; citado por Pesch e Bergmann, 2006) que atribuiu a ele uma possível função mecânica. Posteriormente, foram observadas similaridades entre o desenvolvimento acrossomal e a formação de gotas secretórias do complexo de Golgi, de onde se propôs a origem da estrutura (Burgos e Fawcett, 1955). O acrossoma é uma vesícula que cobre como uma capa dois terços da superfície da cabeça do espermatozói de e a qual contém enzimas hidrolíticas, tais como acrosina, hialuronidase e outras hidrolases e esterases. Estas enzimas são essenciais na lise da zona pelúcida que reveste o oócito, permitindo a penetração da corona radiata (Pesch e Bergmann, 2006). Para serem liberadas, um complexo mecanismo deve ocorrer, denominado reação acrossômica, no qual a membrana acrossomal externa se une à membrana plasmática gerando a liberação do conteúdo da vesícula acrossômica. Entre o acrossoma e o núcleo existe um espaço com conteúdo amorfo de baixa densidade, cuja função é provavelmente a de atuar como uma camada de adesão entre o núcleo e a vesícula acrossomal (Fawcett, 1970). O núcleo do espermatozói de possui cromatina altamente condensada que codifica a informação genética, a qual é possível observar com o auxílio de microscopia eletrônica de transmissão. Esta formação é resultado da interação do DNA com as protaminas, as quais substituem as histonas e são responsáveis pela condensação final e estabilização da cromatina espermática (Rovan, 2001). Apenas na região do colo existe uma pequena área de cromatina não condensada onde ainda são possíveis a transcrição, tradução e biossíntese de proteínas

(Dadoune et al, 2004). Os produtos desta biossíntese são descartados pelos poros presentes exclusivamente na porção do colo da membrana nuclear. A cabeça do espermatozóide também possui pequenos vacúolos nucleares, tidos como pequenos defeitos na condensação da cromatina, os quais na espécie equina só podem ser visualizados com o auxílio de microscopia eletrônica (Pesch e Bergmann, 2006).

O colo possui aproximadamente 1µm e é ancorado em sua parte anterior pelo disco basal e posteriormente pelas fibras externas densas do flagelo. É um pequeno segmento entre a cabeça do espermatozoide e o flagelo composto por colunas segmentadas e uma estrutura fibrosa densa, o capítulo. Próximo ao capítulo situa-se o centríolo proximal, da mesma forma que o centríolo distal está ausente no espermatozoide maduro, tendo servido na formação do axonema durante a espermatogênese (Pesch e Bergmann, 2006). A cauda é a parte mais longa do espermatozoide (55µm) sendo formada pela peça intermediária, peça principal e peça terminal. A peça intermediária caracteriza-se pela presença de um grande número de mitocôndrias dispostas em formato helicoidal que envolvem o axonema e as fibras externas densas, possuindo a função de produzir a energia necessária para a motilidade espermática. O axonema consiste em um par central de microtúbulos circulado por nove pares de microtúbulos periféricos. O par de microtúbulos centrais conecta-se entre si através de pequenas pontes compostas por duas proteínas principais, a dineína e a tubulina (Warner, 1976; Olson e Linck, 1977; Alberts, 2004). O ATP produzido pelas mitocôndrias é degradado pelas ATPases presentes nos braços de dineína, gerando a transformação da energia química na forma de ATP em energia cinética através do deslocamento de microtúbulos adjacentes uns sobre os outros. Isto resulta no dobramento do axonema, iniciando o movimento flagelar (Mortimer, 1997).

Ao final do envoltório de mitocôndrias está o annulus, o qual demarca a barreira entre a peça intermediária e a peça principal. O annulus mostra-se denso e homogêneo com a membrana flagelar firmemente aderida a si. Sua função consiste em prevenir o deslocamento caudal das mitocôndrias durante o movimento da cauda. A peça principal é o segmento mais longo da cauda. Nela, o axonema é envolto por fibras provenientes das colunas longitudinais, uma dorsal e outra ventral, e por espécies de “costelas” orientadas em círculo até a metade da cauda (Pesch e Bergmann, 2006). Distalmente, a estrutura 9+9+2 é perdida na peça terminal transformando-se em 18 microtúbulos separados (Afzelius et al, 1995) (Figura 1).

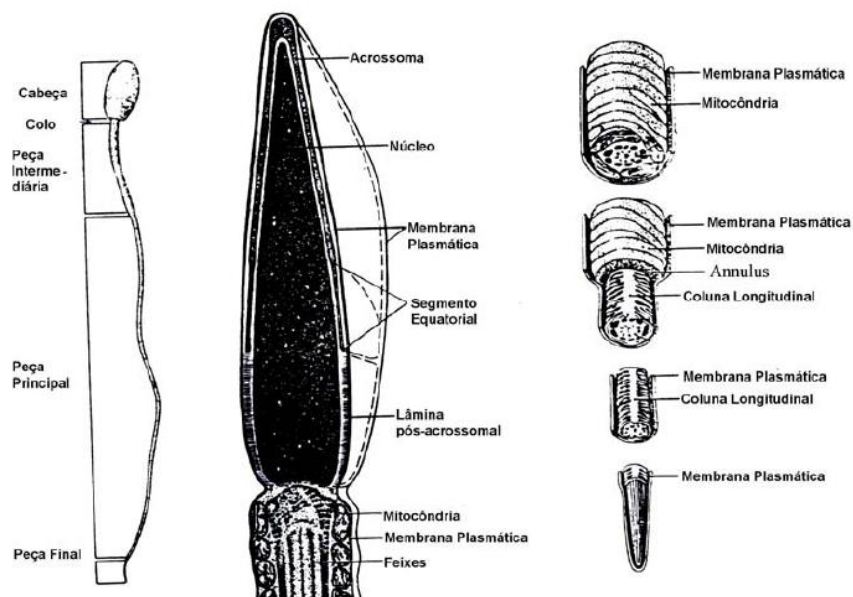


Figura 1: Morfologia do espermatozóide equino (Amann e Pickett, 1987).

3.2. Membrana espermática

Estruturas membranosas fazem parte da constituição do espermatozoide, tais como a membrana plasmática, a membrana acrossomal externa e interna, a membrana nuclear e a membrana mitocondrial. Todas elas possuem estrutura similar, ainda que difiram bioquimicamente. As membranas são compostas de lipídios e proteínas dispostos em uma bicamada, com os fosfolipídios dispostos de tal maneira que a porção hidrofílica esteja voltada para o exterior e a porção hidrofóbica voltada internamente (Figura 2). A membrana plasmática envolve o espermatozoide em sua totalidade, define os seus limites e mantém as diferenças entre o citosol e o ambiente extracelular (Amann e Graham, 1992; Alberts et al., 2004). A composição lipídica do espermatozoide equino é de aproximadamente 57% de fosfolipídios, 37% de colesterol e 6% de glicolipídios. Os fosfolipídios são divididos em fosfoglicerolipídios e esfingomiéline, sendo que no caso da espécie equina, o espermatozoide possui aproximadamente 48% de fosfocolineglicerídeos, 16% de fosfoetanolaminaglicerídeos, 13% de esfingomiéline, 15% de fosfatidilserina, 5% de fosfatidilglicerol e 3% de fosfatidilinositol (Gadella et al., 2001). As diferenças no comprimento e na saturação da cauda de ácidos graxos são importantes, pois influenciam na habilidade das moléculas de fosfolipídios em se agrupar, afetando, conseqüentemente, a fluidez da membrana (Alberts et al., 2004). Os ácidos graxos predominantes no espermatozoide equino são o docosapentanóico (C22:5 n-6), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0). O espermatozoide da espécie equina difere dos demais na alta incidência de ácidos graxos 22:5 entre seus fosfolipídios em relação aos ácidos graxos 22:6, quando em outras espécies este padrão é inverso (Gadella et al., 2001). Garanhões que possuem ejaculados mais resistentes ao tratamento pelo frio possuem predominância de C22:5 n-6, enquanto os garanhões com ejaculado de menor resistência (“bad coolers”) possuem mais C18:0 e C16:0 e menos C22:5 n-6. Esse efeito provavelmente se deve a menor sensibilidade a peroxidação lipídica e melhor funcionalidade da membrana nos ejaculados resistentes (Pesch e Berhmann, 2006).

As proteínas se misturam aos lipídios nesta estrutura representando mais de 50% do peso da maioria das membranas, e desempenham a maioria das funções específicas da mesma. São classificadas em proteínas integrais e periféricas (Amann e Pickett, 1987). As proteínas integrais são removidas apenas com o auxílio de solventes e detergentes enquanto as periféricas são solúveis em água. As proteínas integrais atuam como poros ou canais que atravessam as membranas, receptores ou partículas intramembranosas (quando estão entre as duas camadas da membrana). Já as proteínas periféricas aderem a pontos específicos da membrana através de forças eletrostáticas, sendo por isso facilmente removíveis.

A membrana plasmática não é homogênea possuindo regiões com constituição lipídica e glicoproteínas específicas. Estes domínios de membrana são importantes no desempenho de funções específicas em cada área, como por exemplo, na zona equatorial responsável pelo contato com a membrana do oócito durante a fertilização (Pesch e Bergmann, 2006).

A proporção entre colesterol e fosfolipídios com cadeias de ácidos graxos poli-insaturados, bem como a natureza dos fosfolipídios determinam a fluidez da membrana. No espermatozoide equino essa proporção é de 0,36, um valor médio em comparação a outras espécies (bovino e suíno) (Amann e Graham, 1992; Parks e Graham, 1992). O colesterol estabiliza a membrana plasmática de tal forma que quanto maior a concentração de colesterol presente, menos fluída e flexível é esta área da membrana. Já foi mostrado, que porções da

membrana plasmática com maior proporção de colesterol são mais resistentes às mudanças de temperatura. Conforme Amann e Picket (1987) os espermatozoides da espécie equina são mais sensíveis ao choque térmico durante a redução da temperatura porque possuem relativamente pouco colesterol na sua membrana plasmática.

No lado extracelular da membrana espermática, existem estruturas de carboidratos ligados às proteínas da membrana ou a lipídeos específicos, conhecidas como glicocálix. Tem sido proposto que estas estruturas desempenham um importante papel na interação

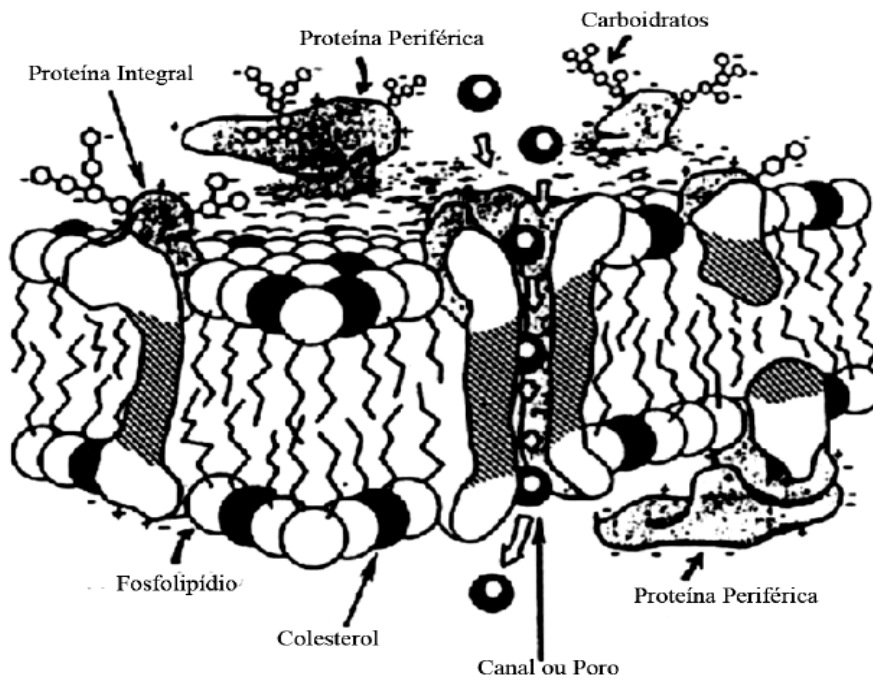


Figura 2: Organização da membrana plasmática; modelo “mosaico fluido” (Singer e Nicolson, 1972).

espermatozoide-oócito, sendo a primeira estrutura do espermatozoide a entrar em contato com o oócito. Também se tem teorizado sua função na organização da membrana através da sua ligação com as proteínas e glicolipídios (Flesch e Gadella, 2000).

3.3. Capacitação espermática

O espermatozoide maduro possui três regiões altamente especializadas: a cabeça do espermatozoide que contém o DNA; a peça intermediária, que contém as mitocôndrias e está envolvida na produção de energia; e o flagelo responsável pela motilidade da célula. Contudo, o espermatozoide após a ejaculação não está apto à fertilização e para tanto necessita passar por uma série de mudanças metabólicas e na membrana enquanto atravessa o trato reprodutivo feminino. Estas mudanças são agrupadas em um processo denominado capacitação espermática (Mortimer et al, 1998).

A capacitação inclui múltiplas modificações fisiológicas e bioquímicas. As bioquímicas incluem: saída de colesterol da membrana levando a um aumento da fluidez da mesma e da permeabilidade aos íons bicarbonato e cálcio; hiperpolarização da membrana plasmática; mudanças na fosforilação das proteínas e atividade das proteínas quinases; aumento nas

concentrações de bicarbonato, AMPc e do pH intracelular (Gadella et al, 2001). O processo de capacitação pode ser dividido em duas cascatas de eventos: a rápida e a lenta. Os eventos rápidos incluem a ativação do movimento assimétrico e vigoroso do flagelo assim que o espermatozoide deixa o epidídimo. Já os lentos caracterizam-se pela mudança nos padrões de movimento flagelar denominado hiperativação. O início dos eventos lentos da capacitação é marcado pela remoção de colesterol das membranas com consequente aumento da fluidez da mesma (Ickowicz et al, 2012).

Por se tratar de uma célula altamente especializada, o espermatozoide possui limitações na produção de proteínas e no transporte vesicular, devidos principalmente à perda de muitas das organelas celulares e a cessação da transcrição do DNA. Desta forma, os componentes da membrana plasmática não podem ser ressintetizados (Gadella et al, 2001). Entretanto, durante a passagem do espermatozoide pelo epidídimo, a membrana plasmática passa por mudanças como secreção, modificação e absorção de proteínas e lipídios. Estas alterações podem estar envolvidas na preparação do espermatozoide para sua ligação ao oócito (Flesch e Gadella, 2000). Durante a ejaculação, proteínas do plasma seminal se aderem à membrana espermática, formando uma capa de glicoproteínas. Esse artifício é denominado de decapacitação espermática (Senger, 2003) (Figura 3). Já durante o processo de capacitação, a membrana espermática passa por reorganizações drásticas visando adquirir habilidade para fertilização. As maiores modificações envolvem alterações nos componentes da membrana que podem ser modificados ou removidos por secreções do trato genital feminino, provocando a

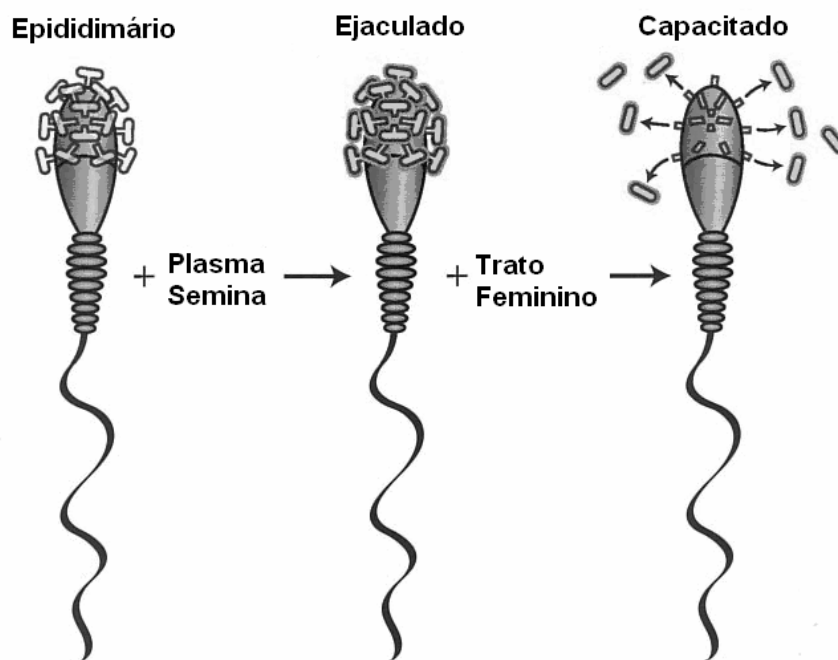


Figura 3: Adesão de proteínas do plasma seminal à membrana plasmática (decapacitação espermática); Espermatozói de capacitado nos fluidos do trato feminino (Senger, 2003).

desestabilização da bicamada lipídica.

No trato genital feminino, a capa glicoprotéica é removida ou modificada (Gadella et al., 2001) para alterar o fluxo iônico transmembrana, expor sítios de receptores da membrana espermática e remover componentes que estejam cobrindo a cauda os quais restringem a

hiperativação do espermatozoide. Outras proteínas do plasma seminal atuam na remoção de substâncias da membrana, como é o caso do colesterol. As proteínas BSP do plasma seminal bovino foram associadas ao processo de capacitação através da ação direta na retirada de colesterol da membrana (Manjunath e Thérien, 2002). Na espécie equina também foram encontradas estas proteínas (HSP-1 e HSP2) as quais apresentam uma grande homologia com as BSP (Töpfer-Petersen et al., 2005). A retirada de colesterol favorece a saída de fosfolípidios no início da capacitação, o que é reforçado por ação conjunta de lipoproteínas de alta densidade (HDL), presentes na tuba uterina (Manjunath e Thérien, 2002). A desestabilização da membrana provocada pela remoção do colesterol promove a reorganização dos componentes da bicamada, incluindo redistribuição de proteínas integrais (Amann e Graham, 1992; Gadella et al., 2001; Gadella e Colenbrander, 2003). As ligações com as proteínas BSPs parecem ser perdidas por ocasião da interação do espermatozoide com as células epiteliais do oviduto (Töpfer-Petersen et al, 2000). A redução das concentrações de colesterol somente ocorre em espermatozoides estimulados pelo bicarbonato (Gadella et al, 2001). O efluxo de colesterol durante a capacitação *in vitro* aumenta a desordem do arranjo fosfolipídico e a permeabilidade da bicamada, os quais podem ser mensurados através de corantes fluorescentes, como a merocianina (Thomas et al, 2006). O aumento da fluidez é essencial para que ocorram diversos eventos importantes da capacitação, inclusive a reação acrossômica e a fusão espermatozoide-oócito (Thomas et al, 2006).

As lipases vêm sendo correlacionadas a capacitação espermática e consequente reação acrossômica. Estas enzimas clivam fosfolípidios intactos em ceramidas (esfingomielinase), diacilglicerol (DAG) e alquilacilglicerol (fosfolipase C, PLC), ácido fosfatídico (fosfolipase D, PLD) e em lisofosfolípidios e ácidos graxos livres (fosfolipase A2, PLA₂). Estes catabólitos atuam como mensageiros intracelulares e ativam cascatas de fosforilação de proteínas desencadeadas no espermatozoide durante a reação acrossômica (Flesch e Gadella, 2000).

A fosforilação da tirosina é uma marca da capacitação, ocorrendo nos estágios mais tardios através da ativação da proteína quinase A (PKA). Esta ativação é mediada pelo adenilciclase solúvel dependente de Ca e bicarbonato. O íon cálcio entra na célula através de canais específicos (CatSper) e o bicarbonato pelo cotransportador Na/H₂CO₃ (Ickowicz et al, 2012).

A concentração de bicarbonato é muito baixa (<1mM) durante a armazenagem do espermatozoide na cauda do epidídimo, sendo que no trato genital feminino as células são confrontadas com altas concentrações de bicarbonato (>15mM), tendo possivelmente um papel chave na fosforilação da tirosina (Flesch e Gadella, 2000) (Figura 4).

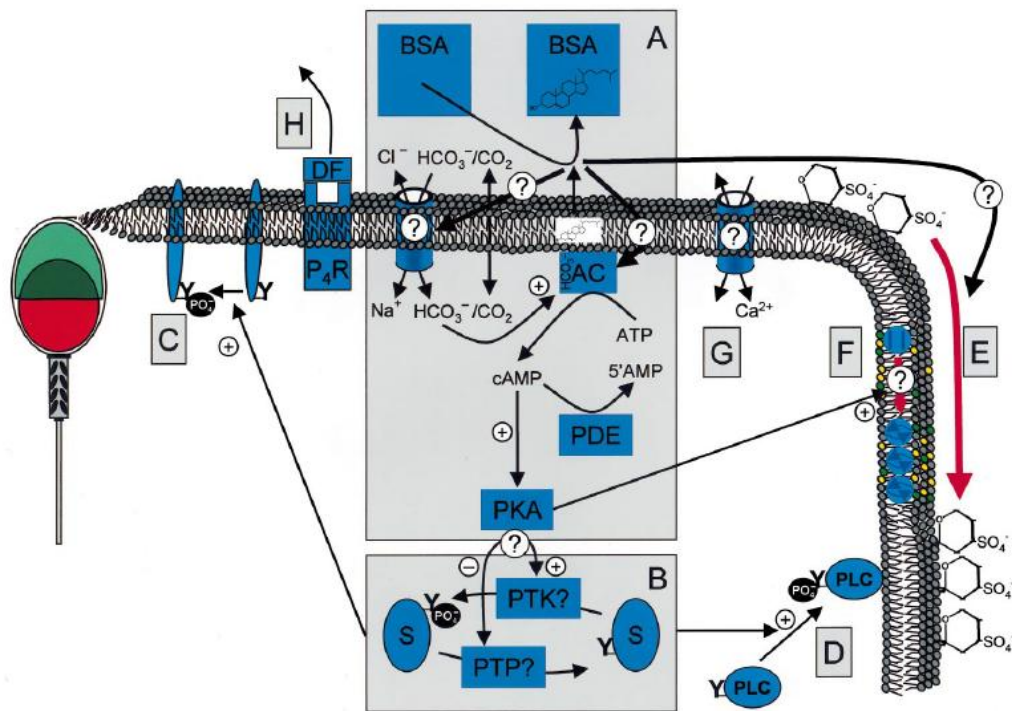


Figura 4: Sequência da capacitação espermática. (A) Bicarbonato pode entrar na célula espermática através dos canais iônicos. O bicarbonato intracelular estimula a AC e a simultânea produção de AMPc ativa a PKA. O efluxo de colesterol pode aumentar a entrada de bicarbonato e afetar a AC. (B) A PKA induz 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 fosfolípidios. (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 decapitantes (DF) são removidos da superfície da célula espermática, expondo os receptores de progesterona (Flesch e Gadella, 2000).

O início da reação acrossômica também está ligado ao aumento da concentração intracelular de cálcio no espermatozoide, sendo que o Ca^{+2} extracelular também é requerido para o processo. A reação acrossômica se inicia imediatamente após a primeira ligação da célula espermática à zona pelúcida do oócito. Durante a reação acrossômica são secretadas enzimas hidrolíticas e proteolíticas a fim de hidrolisar e dissolver a matriz da zona pelúcida localmente na direção de penetração do espermatozoide que posteriormente penetra no espaço perivitelínico e funde-se ao oócito. Espermatozoides que sofreram reação acrossômica precoce são incompetentes para fertilizar o oócito (Flesch e Gadella, 2000). A adição de Ca^{2+} em combinação com os Ionóforos de cálcio divalentes, como o A23187, os quais induzem artificialmente a entrada de cálcio no espermatozoide, tem se mostrado efetiva na indução da fusão da membrana plasmática com a membrana acrossômica externa característica da reação acrossômica (Gadella et al, 2001; Landim-Alvarenga et al, 2001). Visconti et al (1999) mostraram que a retirada de colesterol da membrana acelera a capacitação e a reação acrossômica através de uma rápida ativação da PKA e da proteína quinase em condições de capacitação *in vitro*. A presença de glicose também é essencial para a capacitação, visto que não somente atua como fonte de energia permitindo o deslocamento do espermatozoide como também desempenha funções na habilitação do espermatozoide para a fertilização (Goodson et al, 2012).

A ligação da célula espermática ao oócito induz vários sinais no espermatozoide. Um conjunto de sinais desencadeia o influxo de cálcio e a reação acrossômica. O conteúdo acrossomal se dispersa e digere a zona pelúcida. Durante a reação acrossômica, a membrana plasmática se une a membrana acrossomal externa formando vesículas e expondo a membrana acrossomal interna a qual se liga a zona pelúcida. A célula hiperativada penetra a ZP no espaço entre a ZP e a membrana do oócito (espaço perivitelínico). O espermatozoide então se liga lateralmente com a região equatorial ao oolemma sendo envolvido pela membrana e se fundindo ao oócito (Flesh e Gadella, 2000) (Figura 5).

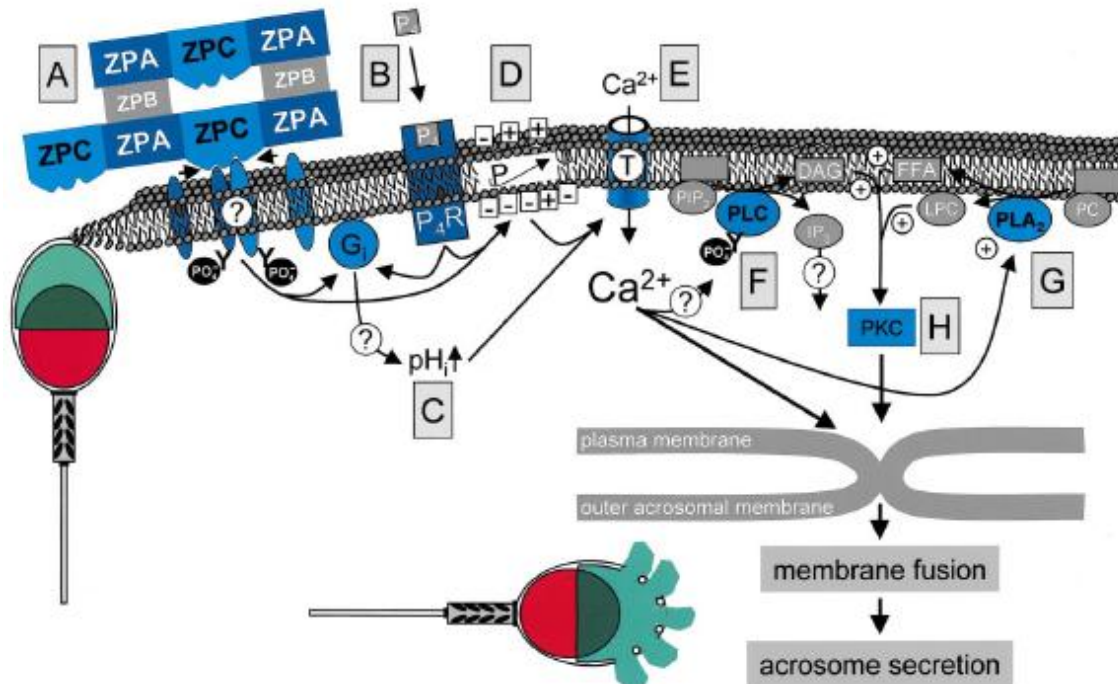


Figura 5: Sequência da reação acrossômica. (A) as proteínas da zona pelúcida (ZP) se ligam aos receptores espermáticos, promovendo a agregação e a fosforilação da tirosina. (B) O ambiente das ZP contém alta concentração de progesterona, que pode se ligar a um receptor na superfície espermática. Ambos, 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) Esse aumento do pH, juntamente com a despolarização da membrana, promovem maiores concentrações de cálcio intracelular, que por sua vez (F) ativa a translocação da PLC para a membrana plasmática durante a capacitação. (G) O aumento do cálcio intracelular ativa a fosfolipase A (PLA) que degrada os fosfolípidios em ácidos graxos livres e, conseqüentemente, (H) estimulam uma proteína kinase C (PKC) (Flesh e Gadella, 2000).

3.4. Hiperativação

A propulsão do espermatozoide via batimento flagelar é vital para sua movimentação pelo trato reprodutivo feminino. Quando o espermatozoide é expelido do epidídimo durante a ejaculação e entra em contato com as secreções das glândulas sexuais acessórias, a adenililciclase solúvel é ativada e gera o aumento das concentrações intracelulares de AMPc (Chen et al, 2000; Carlson et al, 2007). Isto estimula a cascata de fosforilação de proteínas que

ativam a motilidade do espermatozoide (San Agustin e Witman, 1994). Este primeiro perfil de motilidade é caracterizado por batimentos flagelares simétricos e de baixa amplitude que produzem uma trajetória de movimentação linear (Olson et al, 2011).

Uma vez capacitado, o espermatozoide demonstra um padrão vigoroso de movimentação denominado hiperativação. A hiperativação espermática refere-se a uma mudança no padrão de motilidade dos espermatozoides, com batimentos flagelares assimétricos e de alta amplitude, que inclui um aumento na velocidade curvilinear (VCL) e amplitude lateral da cabeça (ALH), e uma redução da velocidade progressiva e linearidade. Estas alterações induzem a um padrão de motilidade circular que ajuda os espermatozoides a se destacarem do epitélio tubário, migrarem através do lúmen da tuba uterina e penetrarem na zona pelúcida (Ortgies et al., 2010). A hiperativação não ocorre normalmente no sêmen sob circunstâncias normais, sendo que menos de 1% de plasma seminal (v/v) pode inibir o teste de penetração em oócito de hamster (Kanwar *et al.*, 1979) e o ensaio de ligação a zona pelúcida em humanos (Huyser *et al.*, 1997).

O padrão de batimento flagelar assimétrico e de alta amplitude tem se mostrado altamente dependente da concentração de Ca^{2+} intracelular, mostrando o papel crucial do cálcio na hiperativação espermática (Okabe, 2013). O Ca^{2+} que origina o processo de hiperativação *in vivo* pode ser originário da abertura dos canais de Ca^{2+} da membrana e/ou da secreção do Ca^{2+} dos reservatórios intracelulares (Olson et al, 2011). Os canais CatSper localizados na membrana plasmática da peça principal são a fonte primária de Ca^{2+} para hiperativação em espermatozoides de hamster (Ren et al, 2001; Carlson et al, 2003). Eles se abrem em resposta ao aumento do pH intracelular o qual é tipicamente associado com a capacitação espermática (Loux et al, 2013). O mecanismo exato pelo qual os canais CatSper induzem a hiperativação ainda não é claro, e pode envolver não somente o influxo de cálcio do ambiente como também do cálcio originado dos depósitos internos próximos ao colo do espermatozoide, possivelmente do envelope nuclear redundante (Loux et al, 2013). O envelope nuclear redundante (RNE) localizado na base do flagelo contém depósitos de Ca^{2+} (Ho e Suarez, 2001). Estes depósitos são possivelmente abertos por um mecanismo ligado ao 1,4,5-trifosfato (IP_3) (Olson et al, 2011). Os canais CatSper foram identificados no espermatozoide equino contudo, a relação de influxo de cálcio com indução da hiperativação foi considerada fraca (Loux et al, 2013).

McPartlin et al (2009) sugeriram que a possível limitação da fecundação *in vitro* (FIV) na espécie equina seria a falha na indução da hiperativação *in vitro*. Estes autores relataram taxas de 61% de fertilização com o uso de procaína. A procaína é um anestésico local que tem demonstrado induzir hiperativação em espermatozoides de diferentes espécies de mamíferos, possivelmente aumentando a permeabilidade da membrana plasmática ao cálcio. O sucesso da FIV equina após a indução farmacológica da hiperativação sugere que os mecanismos típicos de capacitação espermática (incubação em meios com cálcio, bicarbonato e proteína) não estimulam adequadamente a hiperativação na espécie equina, o que pode indicar um mecanismo diferente de indução da hiperativação quando comparada as outras espécies. A procaína por sua vez parece atuar independentemente dos canais CatSper no espermatozoide equino e sua indução de hiperativação não dependeria de um influxo de cálcio externo (Loux et al, 2013).

A capacitação e hiperativação espermática requerem um meio de fornecimento de cálcio e bicarbonato, bem como a ativação da síntese de cAMP para que se obtenha sucesso na

fertilização. Todavia, os mecanismos moleculares de indução dos dois estados parecem ser independentes (Suarez, 2008). Uma ligação entre os processos de capacitação e hiperativação é que ambos não ocorrem comumente no sêmen, possivelmente devido à presença dos fatores decapacitantes do plasma seminal (Cross, 1996).

3.5.Princípios de criopreservação do sêmen

Em 1957, nasceu o primeiro potro fruto da tecnologia do sêmen congelado (Barker e Gandier, 1957). A partir de então, os avanços nesta área levaram a criopreservação do sêmen equino a uma posição de destaque no mercado. O processo de criopreservação do sêmen permite o armazenamento das células espermáticas por longos períodos contribuindo para a comercialização do sêmen independentemente do tempo de transporte e do local onde estão o garanhão e a égua, e para a preservação do sêmen de animais de alto valor zootécnico. Suas vantagens incluem a maximização da utilização de garanhões premiados e a redução nos custos de transporte das éguas, bem como a redução do potencial de transmissão de doenças. Graças ao congelamento do sêmen, as distâncias geográficas são abolidas permitindo uma seleção a partir de um número maior de garanhões, incluindo aqueles já falecidos. Tal tecnologia também permite o uso do sêmen do garanhão mesmo quando este se encontra participando de eventos, doente ou lesionado. Devido à vantagem do armazenamento, o envio do sêmen congelado também fica desvinculado a detecção do estro na égua (Miller, 2008). Contudo, este tipo de processamento gera diversos danos aos espermatozoides, os quais por sua vez comprometem a viabilidade, a motilidade e funções fisiológicas mais complexas dentro da célula (Roca et al, 2013). Muitos garanhões apresentam fertilidade reduzida com o uso do sêmen congelado. E mesmo o melhor sêmen necessita de um meticuloso trabalho de controle folicular das éguas. A criopreservação também é considerada um processamento de mais alto custo em relação à inseminação com sêmen fresco e refrigerado, o que associado aos custos de manejo das éguas, pode fazer da técnica uma opção cara. A alta variabilidade entre garanhões na tolerância ao processo de criopreservação é mais um complicador. Historicamente, os garanhões têm sido selecionados por sua constituição ou seu desempenho esportivo, enquanto a sua fertilidade é ignorada na maioria das vezes, em detrimento ao seu desempenho reprodutivo. Desta forma a qualidade do sêmen congelado varia muito entre os garanhões, sendo estes classificados como de boa, média ou fraca congelabilidade, dependendo da capacidade para suportar os processos de congelamento e descongelamento (González-Fernández et al, 2012).

Para fecundar um oócito, o espermatozoide precisa apresentar pelo menos quatro atributos pós-descongelamento: metabolismo para a produção de energia; motilidade progressiva; enzimas acrossomais intactas, necessárias para a penetração do espermatozoide através das estruturas que circundam o oócito; e proteínas de membrana plasmática, importantes para a sobrevivência da célula espermática dentro do trato reprodutivo feminino e para a junção da mesma ao oócito no momento da fecundação (Amann e Pickett, 1987; Pickett e Amann, 1992).

O processo de criopreservação do sêmen, contudo, tem profundos efeitos nos espermatozoides, muitos dos quais resultam em danos subletais às células, e subsequente redução da fertilidade (Ricker et al, 2006). Tais danos incluem desestabilização da membrana devido ao rearranjo lateral lipídico, a perda de lipídios da membrana e sua peroxidação como resultado da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes eventos afetam a motilidade dos espermatozoides, o poder de resposta ao estresse osmótico e às vias de

senalização, resultando em comprometimento do potencial de ligação e reação com a zona pelúcida (Holt, 2000).

Os danos ocorridos durante a criopreservação são atribuídos às mudanças na temperatura, formação de cristais de gelo, danos oxidativos, alterações na membrana espermática, danos no DNA, toxicidade dos crioprotetores e estresse osmótico (Watson, 2000).

Quando o sêmen é resfriado abaixo de 0° C, cristais de gelo extracelular começam a se formar. Isto resulta num aumento da concentração de sais no fluido extracelular. Inicialmente, a água dentro dos espermatozoides não congela, mas é resfriada abaixo do ponto de congelamento. A água se move do interior do espermatozoide para o ambiente extracelular e, portanto, a célula espermática desidrata continuamente. Se a água não pode deixar o espermatozoide rapidamente, há a formação de gelo intracelular o qual pode danificar a célula. Se a taxa de resfriamento for muito lenta, a elevada concentração de sais dentro da célula pode danificá-la. O sucesso do processo de congelamento também é limitado pelo processo de descongelamento. Em termos gerais, se a taxa de resfriamento (processo de congelamento) é rápida, a taxa de aquecimento (processo de descongelamento) também deve ser rápida. Alternativamente, se a taxa de resfriamento é lenta a taxa de aquecimento também deve ser lenta (Amann e Pickett, 1987) (Figura 6). Surpreendentemente a membrana plasmática do espermatozoide equino parece ser capaz de responder a uma vasta gama de insultos osmóticos sendo ainda capaz de recuperar o seu volume isosmolar. Apesar da elevada resistência aparente da membrana plasmática, funções celulares são prejudicadas. Dentre outros efeitos deletérios temos a diminuição da viabilidade, uma queda no potencial de membrana das mitocôndrias (MMP) e redução da motilidade após o descongelamento (Flesch e Gadella, 2000; Vidament et al, 2000). Durante o processo de congelamento, os espermatozoides são submetidos a estresse osmótico no momento quando os diluidores de congelamento são adicionados e depois de sua adição. Visando minimizar o choque osmótico, agentes crioprotetores são adicionados aos diluidores de congelamento (Ricker et al, 2006).

Os agentes crioprotetores não penetrantes são representados por macromoléculas com alto peso molecular, tais como os açúcares, a lipoproteína da gema do ovo, as proteínas do leite e alguns aminoácidos. Estas substâncias são responsáveis por um mecanismo de proteção no meio extracelular. Algumas atuam através de um efeito osmótico, no qual é induzida a saída da água do interior da célula para prevenir a formação de cristais de gelo no meio intracelular, sendo que outras promovem uma maior estabilidade da membrana plasmática (Amam e Pickett, 1987).

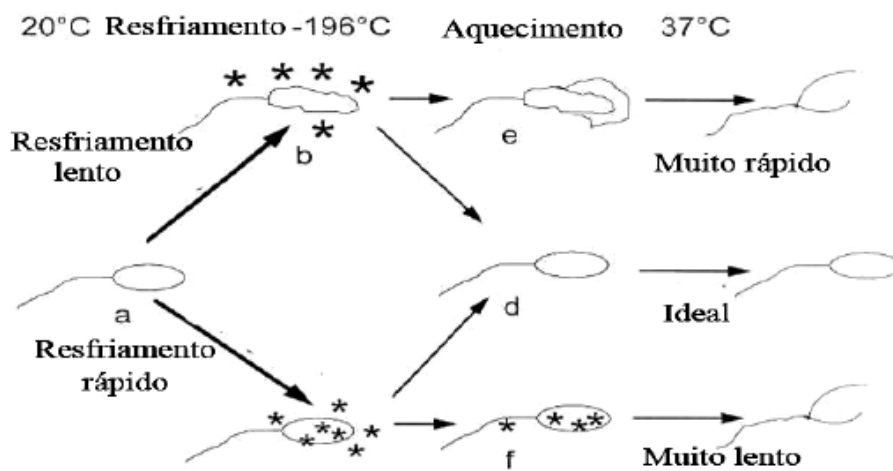


Figura 6: Representação esquemática das mudanças físicas no espermatozóide equino durante o congelamento (Amann e Pickett, 1987).

Os crioprotetores penetrantes possuem um mecanismo de ação baseado em suas propriedades coligativas ou propriedades de ligação com a molécula da água, ou seja, os agentes crioprotetores penetrantes tem estruturas que promovem ligações de hidrogênio com a molécula da água. São estas ligações que mudam a orientação desta nos cristais de gelo e criam um ambiente menos nocivo para as células espermáticas. Portanto, esta propriedade modifica as características durante o processo de congelamento limitando a formação de cristais de gelo, retardando o crescimento dos cristais e reduzindo as concentrações de soluto no meio extracelular (Nash, 1966; Watson, 1979; Dalimata & Graham, 1997). As características físico-químicas ideais de um agente crioprotetor penetrante incluem um baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e principalmente uma baixa toxicidade celular (Nash, 1966). Espermatozoides parecem ser sensíveis ao stress osmótico associado com a adição e remoção de grandes quantidades de crioprotetores, bem como a alterações nas concentrações de soluto durante o congelamento (Watson, 2000; Ball e Vo, 2001).

A adição de glicerol ou outros crioprotetores permeáveis (CPA) resulta em um aumento transitório da pressão osmótica antes que ocorra o equilíbrio de suas concentrações entre os dois lados da membrana (Ball e Vo, 2001). Como ocorre o congelamento do meio extracelular durante o resfriamento pensa-se que a água congela deixando o espermatozoide suspenso em pequenos compartimentos de meio que possuem osmolaridade cada vez maior devido à presença de concentrações crescentes de soluto na água descongelada. Diferenças na permeabilidade de glicerol e água também são temperatura dependentes, sendo responsáveis por uma parcela considerável do estresse osmótico (Ball e Vo, 2001; Pommer et al, 2002). Quando as células preenchidas com glicerol são abruptamente transferidas para um meio isotônico livre de glicerol (como os diluidores de leite desnatado ou as secreções do trato reprodutivo feminino) o ambiente intracelular torna-se hiperosmótico em relação ao meio extracelular. Como a permeabilidade do glicerol é menor que a da água, ocorre entrada de água intracelular com consequente aumento do volume celular. Se as mudanças de volume da célula excedem a sua tolerância osmótica, pode resultar em lise celular. Evidências experimentais recentes corroboram ainda mais a observação de que seria o estresse osmótico, em vez da formação de gelo intracelular, o responsável por grande parte dos danos ocorridos no espermatozoide equino durante o congelamento e descongelamento na presença de glicerol (Morris et al., 2007).

As múltiplas temperaturas de transição observadas durante o congelamento do sêmen corroboram com a ideia de que a membrana plasmática possui regiões especializadas laterais em subdomínios. A coexistência de fases fluídas e em gel de lipídios seria a principal origem da organização heterogênea da membrana (Flesch e Gadella, 2000).

3.6. Processo de criopreservação de semen

O sêmen equino normalmente é coletado com o auxílio de uma vagina artificial (Amann e Pickett, 1987; Hafez, 1995). Em seguida, são avaliadas a coloração e aspecto do ejaculado, e com auxílio da microscopia, características como motilidade total, motilidade progressiva, vigor, concentração espermáticas (Hafez, 1995). Para a criopreservação, deve-se selecionar ejaculados que apresentem pelo menos 50% de motilidade progressiva e no mínimo 60 milhões espermatozoides/mL (Jasko, 1992).

Após a adição de diluidor ao sêmen, geralmente na proporção de 1:1, é preconizada a realização da centrifugação visando dois objetivos: 1) eliminação de 90% do plasma seminal, e 2) criação de uma suspensão com alta concentração de espermatozoides. A remoção do plasma seminal antes do congelamento melhora a motilidade dos espermatozoides pós-descongelamento, pois a alta concentração de cloreto de sódio presente no líquido seminal pode gerar danos aos espermatozoides preservados *in vitro*. Por outro lado, o plasma seminal contém componentes que protegem as membranas durante a criopreservação, cuja composição pode variar entre ganhões. Tal fato pode explicar a diferente congelabilidade dos espermatozoides de ganhões (Moore et al., 2005). Portanto, a permanência de 10% de plasma seminal pós-centrifugação é benéfica à motilidade espermática equina pós-descongelamento (Amann e Pickett, 1987; Jasko et al., 1992; Pickett e Amann, 1992; Brinsko et al., 2000). Ainda assim, o processo de centrifugação não é inócuo gerando efeitos deletérios sobre os espermatozoides. Estes podem ser minimizados ao se utilizar uma baixa força centrífuga (300-400G) por tempo adequado (10-15min) ou através da diluição do sêmen prévia à centrifugação (Amann e Pickett, 1987; Graham, 1996). Os diluidores normalmente utilizados para o processo de centrifugação são: citrato - EDTA, glicose - EDTA e lactose - EDTA, glicose-leite desnatado, leite desnatado UHT, INRA 82, entre muitos outros (Kenney et al., 1975; Mckinnon, 1996; Vidament, 2005). Após o processo de centrifugação, aspira-se e despreza-se o sobrenadante e em seguida ressuspende-se o sedimento, constituído de espermatozoides, com o diluidor de congelamento. Tem-se utilizado concentrações finais que variam de 25 a 400 milhões espermatozóides/mL (Jasko, 1994; Vidament et al., 1997). Contudo os melhores resultados são observados com concentração de 100 ou 200 milhões de espermatozóides/mL (Nascimento, 2006).

Para o sêmen ser armazenado a baixas temperaturas é necessário que os espermatozoides sejam preservados com diluidores apropriados (Amann e Pickett, 1987; Holt, 2000). Os diluidores seminais reduzem a concentração de plasma seminal, controlam o pH e a osmolaridade, suprem os espermatozoides com nutrientes e antimicrobianos, além de proteger o espermatozoide do choque térmico durante o armazenamento. Os diluidores de sêmen possuem uma série de componentes básicos como a água (como solvente); tampões e substâncias não iônicas (atuam na manutenção da osmolaridade e pH do meio); macromoléculas da gema do ovo e do leite (prevenindo o choque térmico); carboidratos (fonte de energia); antibióticos (controlam o crescimento microbiano); detergentes (emulsificam os lipídios presentes na gema de ovo, permitindo melhor interação entre esses componentes e a membrana plasmática); quelantes que se ligam ao cálcio e ao magnésio (limitam o movimento de íons bivalentes por meio da membrana, impedindo que penetrem nas células espermáticas e as danifiquem durante o choque térmico) (Amann e Pickett, 1987). Um diluidor de leite integral aquecido contendo 10% de glicerol foi utilizado para obter a primeira prenhez com sêmen criopreservado de ganhões (Barker e Gandier, 1957). Independente do protocolo ou técnica de congelamento utilizado faz-se necessário o uso de crioprotetores que possuam a função de proteger as células e tecidos durante o congelamento e o descongelamento. O efeito protetor dessas substâncias foi associado à redução da concentração de soluto e ao aumento das porções de água descongelada e, portanto, do tamanho dos canais de água (Watson, 1995). O glicerol tem sido o crioprotetor mais empregado para a criopreservação de espermatozoides da maioria dos animais domésticos (Amann e Pickett, 1987), inclusive para o equino (Vidament et al. 1997). Smith e Polge (1950) foram os primeiros pesquisadores a relatar o efeito crioprotetor do glicerol. Os efeitos protetores do glicerol são representados por suas propriedades coligativas, pela diminuição do ponto de congelação e pela consequente

redução das concentrações de eletrólitos na fração não-congelada da amostra, sendo que, inicialmente, ele ocasiona um estresse osmótico na célula espermática, impedindo a formação de grandes cristais de gelo intracelulares (Watson, 2000). Contudo, em alta concentração o glicerol apresenta efeitos deletérios, os quais incluem estresse osmótico, mudanças na organização, aumento da fluidez e permeabilidade da membrana, e na sua composição lipídica (Watson, 1995). Foi demonstrada uma superioridade nos parâmetros de motilidade espermática, motilidade progressiva, vigor e integridade da membrana plasmática após o descongelamento com o uso do glicerol na concentração de 2,5% (Vidament et al, 2002; Vidament, 2005).

Os diluidores a base de leite desnatado são rotineiramente utilizados na criopreservação do sêmen equino. Estudos indicam que os componentes ativos envolvidos na proteção do espermatozoide pelo leite são as micelas de caseína, que interagem com as proteínas BSP, as quais, por sua vez, podem promover a retirada de fosfolipídios e colesterol da membrana plasmática (Bergeron e Manjunath, 2006). O fosfocaseinato mostrou-se o componente com maior influência positiva sobre o espermatozoide de garanhões armazenados a 4°C, tanto em sobrevivência quanto em fertilidade (Batellier *et al.* 1997).

A gema de ovo no meio diluidor de criopreservação beneficia os espermatozoides ao manter a pressão coloidal do meio, e também, por conter lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais estabilizam a membrana espermática durante o congelamento e descongelamento, e reduzem os efeitos das proteínas do plasma seminal (Manjunath e Thérien, 2002).

Atualmente, os sistemas de envasamento mais comumente utilizado são as palhetas plásticas com capacidade de 0.5mL com o objetivo de obter um congelamento mais uniforme das amostras (Vidament et al, 1997), embasados pelos achados de Loomis *et al.* (1983).

Para Amann e Pickett (1987), reduções na temperatura abaixo dos 37°C e, especialmente de 20°C, iniciam alterações de natureza biofísica no espermatozoide equino. Estes pesquisadores concluíram que, para o sucesso de um processo de preservação do sêmen em baixas temperaturas, uma série de complexas interações entre diluidor, taxas de resfriamento e temperatura de armazenamento se faz necessário. Pesquisas têm relatado que as taxas de resfriamento podem ser divididas dentro de 3 categorias: lentas (<0,33°C/min); médias (0,33°C/min a 1,0°C/min) e rápidas (>1,0°C/min) (Douglas-Hamilton et al, 1984). Na maioria dos protocolos atualmente disponíveis para o congelamento é utilizada uma curva de congelamento rápida de -60°C/min, sendo obtida pela exposição das palhetas horizontalmente, 3 cm acima do vapor de nitrogênio (Amann e Pickett, 1987). Já os principais fatores a serem considerados no momento do descongelamento são: tipo de envase utilizado, uniformidade de descongelamento em relação à condutividade de calor, espessura da parede das palhetas e a temperatura da água do banho-maria. A taxa de aquecimento do sêmen em palhetas é convencionalmente controlada pela temperatura da água de descongelamento e pela duração da exposição da palheta à água. Amann e Pickett (1987) concluíram que o descongelamento de amostras contidas em palhetas com capacidade para 0,5 mL, deve ser feito à temperatura de 37°C por 30 segundos levando a uma curva de aquecimento de 700°C/min.

3.7. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é resultado de um desequilíbrio entre os sistemas de geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos responsáveis pela sua remoção. Tal equilíbrio é cuidadosamente regulado dentro das células, como também no compartimento extracelular através de uma grande variedade de vias. Se as células espermáticas são expostas a níveis excessivos de ROS, em seguida, a sua capacidade de fertilização e integridade genética poderão ser comprometidas (Aitken, 1999).

No caso dos espermatozoides, as fontes de ROS são externas e internas. A externa, fonte particularmente de ânion superóxido (O_2^-) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), é resultado da contaminação do sêmen com leucócitos. Esta fonte de ROS já foi associada à sub-fertilidade ou até mesmo infertilidade em humanos (Aitken et al., 1996). Quanto à fonte interna de ROS, dois mecanismos envolvidos foram caracterizados em espermatozoides de ratos (Vernet et al., 2001). Um mecanismo é através da fuga das ROS dos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial (Balaban et al, 2005), enquanto o outro mecanismo baseia-se em um sistema enzimático relacionado com a família das NADPH oxidases (NOX) ligadas à membrana plasmática da célula, as quais utilizam os dinucleotídeos de adenina reduzidos (NADP-H) como substrato (Ball et al, 2001; Vernet et al., 2001). Um membro dessa família de oxidases (NOX5) já foi caracterizado nos testículos e espermatozoides equinos indicando um potencial mecanismo para a geração de ROS nestas células (Sabeur e Ball, 2007). Análises da origem da produção das ROS através das NADPH oxidases com o auxílio de nitroblue tetrazolium demonstraram maior concentração na cabeça e peça intermediária dos espermatozoides, o que sugere que a produção de superóxido pode ser atribuída a duas fontes diferentes (Sabeur e Ball, 2006). A capacidade de geração das ROS é significativamente aumentada em espermatozoides anormais (Iwasaki e Gagnon, 1992), particularmente as células com retenção de citoplasma (Gomez et al, 1996). Espermatozoides com gotas citoplasmáticas apresentam maior conteúdo celular de enzimas citoplasmáticas, incluindo a glicose-6-fosfato desidrogenase. Esta enzima é responsável pelo fluxo de glicose através da via das pentoses fosfato com geração associada de NADPH (Baumber et al, 2000).

As concentrações de radicais livres e espécies reativas derivadas de radicais são determinadas através do equilíbrio entre as respectivas taxas de produção e taxas de degradação por vários

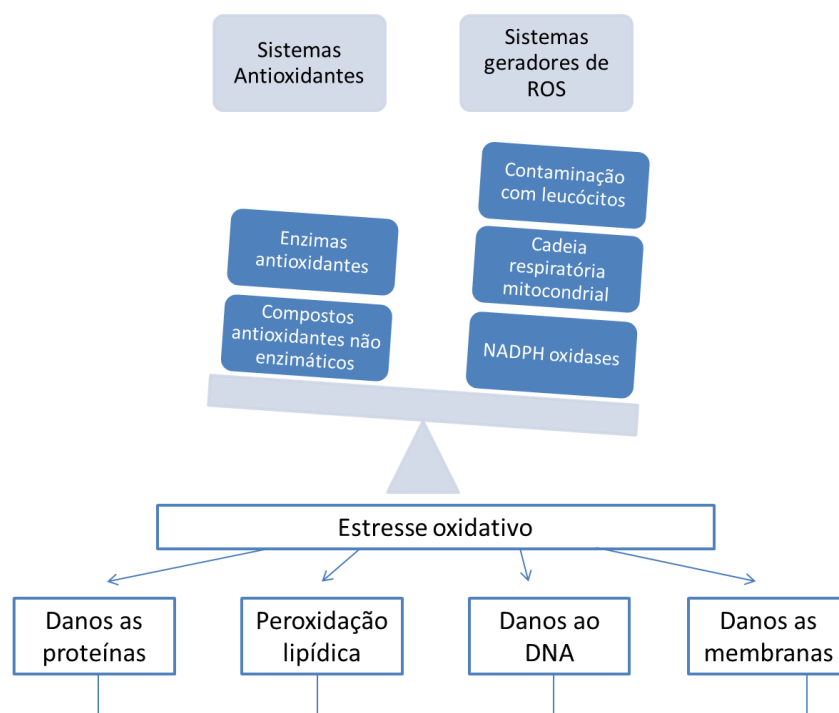


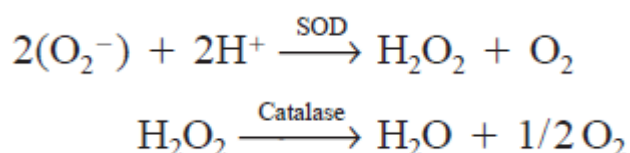
Figura 7: Representação das causas e conseqüências do estresse oxidativo na célula espermática.

compostos antioxidantes e enzimas (Figura 7). Halliwell e Gutteridge (1989) definiram antioxidantes como substâncias que são capazes, em concentrações relativamente baixas, de competir com outros substratos oxidáveis e, assim, retardar ou inibir significativamente a oxidação desses substratos. Esta definição inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx), e a catalase (CAT), bem como compostos não enzimáticos tais como o α -tocoferol (vitamina E), o β -caroteno, o ácido ascórbico (vitamina C), e a glutatona (Dröge, 2002).

Em um estudo realizado por Aurich et al (1997), o antioxidante ácido ascórbico mostrou efeitos protetores sobre a integridade da membrana espermática equina após armazenamento do sêmen refrigerado, sugerindo que os danos causados pelas ROS podem estar relacionados à perda da função do espermatozoide durante o armazenamento do sêmen equino.

Além disso, há compostos que têm uma atividade antioxidante específica relativamente baixa, mas, quando presentes em concentrações elevadas, podem contribuir significativamente para a atividade global de eliminação de ROS. Como exemplos, temos os aminoácidos livres, peptídeos e proteínas. Praticamente todos os aminoácidos podem servir como alvos para ataque oxidativo por ROS, embora alguns aminoácidos, tais como triptofano, tirosina, histidina, e cisteína sejam particularmente sensíveis a ROS (Dröge, 2002).

Como o espermatozoide possui quantidades limitadas de antioxidantes, o plasma seminal mostra-se uma fonte potente destes, que atuam protegendo o espermatozoide dos efeitos adversos das ROS (Ball, 2008). As principais enzimas antioxidantes descritas no sêmen são a catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase. Estas enzimas são bem conhecidas por converterem ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em O_2 e água conforme a equação (Sikka, 2004):



Parece existir uma variação grande na abundância e importância desses antioxidantes no plasma seminal. Baumber e colaboradores (2005) determinaram a atividade relativa destas enzimas no sêmen equino encontrando valores de $98,7 \pm 29,2$ U/mg de proteína, $29,15 \pm 6,64$ U/mg de proteína e $0,87 \pm 0,06\mu M$ de NADPH oxidado/min/mg de proteína, para a CAT, SOD e GPx, respectivamente. A atividade específica da catalase em homogeneizados de tecidos foi significativamente maior na próstata do que na ampola, glândula bulbouretral, glândula vesicular, fluido da cauda do epidídimo ou testículo. Estes dados indicaram que o plasma seminal equino tem uma atividade relativamente maior de catalase e superóxido dismutase, com uma variação significativa entre ganhões. A catalase é uma enzima que apresenta elevada seletividade para o seu substrato H_2O_2 . No entanto, o papel da catalase parece importante apenas para concentrações de H_2O_2 superiores a 10^{-6} M (Vernet et al, 2004).

A exposição dos espermatozoides equinos a condições hipo ou hiperosmóticas resulta em um aumento na geração de ânions superóxido pelas células viáveis do sêmen indicando que existe

uma interação ativa entre estes dois fatores de estresse osmótico e oxidativo (Sabeur e Ball, 2007). O mecanismo dessa interação não está bem caracterizado, no entanto, estudos com outros tipos de células sugerem que a ativação da fosfolipase associada à membrana A2 (PLA2), com consequente ativação de uma NADPH oxidase pode representar uma via potencial para a geração do ânion superóxido em resposta ao estresse osmótico (Lambert, 2003; Lambert et al, 2006).

O resfriamento e descongelamento dos espermatozoides pode causar um aumento na geração de óxido nítrico. O radical NO é produzido em organismos superiores por oxidação de um dos átomos terminais de nitrogênio da L-arginina. Este processo é catalisado pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Dependendo do microambiente, o NO pode ser convertido em vários outras espécies reativas de nitrogênio (RNS), como cátion nitrosônio (NO_1), ânion nitroxil (NO_2) ou peróxinitrito (ONOO_2) (Dröge, 2002). Embora a produção de óxido nítrico permaneça inalterada durante o resfriamento do espermatozoide, uma súbita explosão da produção de radicais de óxido nítrico é observada durante o descongelamento (Meyers, 2012).

Uma grande variedade de compostos tem sido testada em combinação com crioprotetores comuns básicos tais como gema de ovo e leite a fim de minimizar os danos causados pelo congelamento e descongelamento. Estes compostos incluem carnosin, carnitina, hipotaurina, taurina e vitamina E (Sanchez-Partida et al., 1997; Chatterjee e Gagnon, 2001). Os efeitos benéficos de tais antioxidantes fornecem evidências de que o estresse oxidativo ocorre durante a criopreservação (Alvarez et al, 1987;. Alvarez e Storey, 1992; Chen et al., 1993; Sanchez-Partida et al., 1997). As ROS são uma fonte importante de danos ao DNA do espermatozoide, e a adição de antioxidantes pode desempenhar um papel na redução de apoptose durante a armazenagem de sêmen e seu trânsito no trato genital (Sikka, 2004).

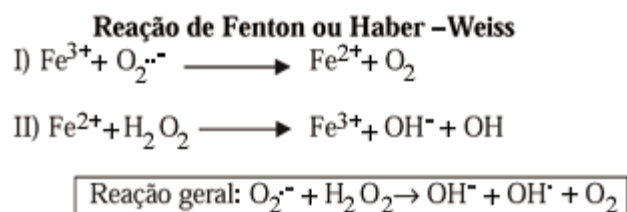
Todavia, as ROS parecem exercer um papel fisiológico no espermatozoide possivelmente relacionado com o processo de transdução de sinais. Muitos eventos fisiológicos dentro das células espermáticas são controlados pelas ROS, como a hiperativação, capacitação, reação acrossômica, ligação à zona pelúcida e penetração no oócito (De Lamirande et al., 1997). Em termos moleculares, já foi mostrado o efeito das ROS no processo de fosforilação da tirosina, intrinsecamente associado à capacitação espermática (Aitken et al, 1995;. Leclerc et al., 1997; De Lamirande et al., 1997; Lewis e Aitken, 2001).

3.8. Peroxidação lipídica

Uma das maiores ameaças aos espermatozoides é a sua extrema susceptibilidade ao dano oxidativo devido ao elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) na membrana plasmática. Esta composição peculiar dá a esta estrutura as propriedades fusogênicas intrínsecas as quais ele necessita para realizar os eventos relacionados à fusão das membranas durante a fertilização (Vernet et al, 2004). No entanto, a presença de altas concentrações de PUFA também torna estas células mais suscetíveis a ataques pelas espécies reativas ao oxigênio (ROS).

O peróxido de hidrogênio parece ser a principal ROS responsável por essas mudanças (Baumber et al, 2000) e a peroxidação lipídica seu mecanismo de ação (Aitken et al 1993; Baumber et al, 2003a, 2003b). A cascata de peroxidação lipídica é iniciada quando as espécies reativas ao oxigênio atacam os ácidos graxos poliinsaturados na membrana da célula espermática. Como consequência da peroxidação lipídica, a membrana plasmática perde a

fluidez e integridade necessárias para a fusão das membranas durante a fertilização. Além disso, a peroxidação lipídica pode também danificar o DNA conduzindo a ligações cruzadas na cromatina, mudanças de base, e quebras na fita de DNA (Baumber et al, 2003). As espécies reativas ao oxigênio, H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$, não possuem energia suficiente para iniciar a peroxidação lipídica, sendo portanto necessária a ação de um metal de transição catalisador. Concentrações muito baixas de ferro presente em quase todas as soluções são suficientes para catalisar a formação de radicais hidroxila a partir de O_2 e H_2O_2 (De Lamirande, 1997). O radical hidroxila pode reagir com qualquer componente celular e é um iniciador extremamente poderoso de peroxidação lipídica (Aitken, 1995). Com a presença de um catalisador, como o Fe^{2+} , as ROS podem iniciar a peroxidação lipídica, através da extração do hidrogênio e consequente formação de um número de radicais reativos (reação de Haber-Weiss). Estes radicais continuam a reação em cadeia, com a formação de peróxidos de lipídios e a formação de aldeídos citotóxicos, incluindo o malondialdeído e o mais potente 4-hydroxynonenol (Aitken, 1995; Ball e Vo, 2002; Ball, 2008).



Embora a peroxidação lipídica seja bem caracterizada nos espermatozoides de mamíferos, o espermatozoide equino parece ser relativamente mais resistente à peroxidação das membranas do que o espermatozoide de outros animais domésticos (Baumber et al, 2000; Neild et al, 2005). A criopreservação, no entanto, aumenta a susceptibilidade da célula equina à peroxidação lipídica, de forma mais pronunciada na região da peça intermediária (Neild et al., 2005; Ball, 2008).

Um componente antioxidante conhecido do plasma seminal equino é a lactoferrina (Lf), uma glicoproteína de 80 kDa, que consiste de dois lobos, e cuja propriedade física mais marcante é a altíssima afinidade ao ferro (Baker e Baker, 2005). A lactoferrina (Lf) já foi encontrada no plasma seminal de garanhões e sua presença correlacionada com a concentração e número total de espermatozoides, refletindo uma possível função na saúde gonadal (Iganaki et al, 2001; Kikuchi et al, 2003). As concentrações de lactoferrina no plasma seminal equino variam de 42 a 453 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com um valor médio de $157 \pm 118 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Inagaki et al, 2002). A lactoferrina parece ser o principal componente dos antígenos de superfície, os quais protegem o espermatozoide (Kobayashi et al, 2007). Além disso, ela exibe atividade bacteriostática e previne a formação de radicais hidroxila, agentes importantes do processo de peroxidação lipídica das membranas (Kikuchi et al, 2003). A biodisponibilidade da Lf parece ser regulada pela presença de moléculas de ligação a lactoferrina, as quais alteram as suas propriedades físico-químicas e assim influenciam a sua atividade biológica e afinidade pelo espermatozoide. Desta forma, a Lf pode ser encontrada no plasma seminal numa forma livre ou associada (Thaler et al, 1990).

Os métodos comumente utilizados para medir as ROS podem ser categorizados em: 1) reações

envolvendo tetrazólio nitroazul ou complexos citocromo c-Fe₃₁ os quais medem as ROS na superfície da membrana celular; 2) reações que medem as ROS (geradas dentro ou no exterior da célula) utilizando quimioluminescência; e 3) o método de ressonância dos elétrons, o qual é mais sensível e pode identificar o tipo de ROS gerado no interior da célula, mas que requer uma operação mais hábil, interpretações precisas e instrumentação cara (Sikka, 2004).

3.9. Métodos de avaliação espermática *in vitro*

Para o desenvolvimento de métodos de congelamento necessita-se de testes *in vitro* que se correlacionem com a fertilidade *in vivo*, visto que ensaios reprodutivos controlados com um adequado número de equinos são extremamente caros (Katila, 2001). A avaliação espermática mais utilizada em laboratórios e fazendas é a de motilidade. Apesar de sua limitada aplicabilidade, este tipo de avaliação é de rápida execução e de fácil acesso. Contudo, sabe-se que a avaliação do sêmen *in vitro* através de outros testes é essencial para prever a fertilidade do sêmen.

Avaliação da motilidade espermática

A motilidade espermática é importante porque é prontamente identificável e reflete vários aspectos essenciais do metabolismo do espermatozoide. Contudo, a motilidade deve ser avaliada juntamente com outros parâmetros a fim de se estimar o potencial fertilizante dos espermatozoides. Normalmente, a motilidade progressiva (espermatozoides com movimento retilíneo e circular amplo) e a total (movimento progressivo e localizado) são estimadas através de porcentagens. O movimento circular amplo no espermatozoide equino é normal e deve-se à alta incidência de ligações abaxiais entre a cabeça e o colo da célula (Kenney et al, 1983). O vigor (velocidade dos espermatozoides) é avaliado em uma escala de 0-5.

Para obter uma estimativa precisa, as condições ambientais devem ser ideais e padronizadas para o sêmen. Todo o equipamento deve ser limpo (de preferência descartável) e antes da utilização, mantido a temperatura corporal por meio do armazenamento em uma estufa ou em placa aquecedora. A temperatura da lâmina deve ser controlada (+ 37 ° C), utilizando uma placa aquecedora sobre o microscópio; a profundidade da suspensão na lâmina deve ser padronizada, sendo que múltiplos campos perto do centro da lâmina devem ser examinados (Katila, 2001).

A avaliação com microscopia em campo claro não requer equipamento caro e é fácil de executar. No entanto, uma grande variação pode ser causada por diferenças entre os examinadores, uma vez que a avaliação é subjetiva e exige experiência. Se a motilidade for baixa, provavelmente não se indicará a utilização do sêmen. Por outro lado, um sêmen com boa motilidade não indica, necessariamente, que a capacidade fertilizante do espermatozoide tenha sido mantida (Hafez, 1995).

Análise espermática computadorizada (CASA)

A avaliação visual subjetiva da motilidade é uma técnica propensa ao erro humano e preconceito. Para tanto, têm sido desenvolvidos métodos mais objetivos, como o baseado em imagens microscópicas analisadas computadorizadamente (CASA). As imagens de vídeo informatizadas do movimento espermático para análise são obtidas a partir da visualização ao microscópio de campos com espermatozoides móveis. Um número definido (geralmente 20 a

30) dos quadros de vídeo sucessivos é analisado a uma taxa constante, tipicamente 30-60 quadros por segundo. Quando todos os quadros para um dado campo foram analisados, algoritmos do computador são usados para distinguir espermatozoides de artefatos e reconstruir as trajetórias dos espermatozoides (Jasko, 1992). Cada espermatozoide é classificado como móvel ou sem motilidade, e a concentração de ambos é calculada. Os dados de motilidade são ainda caracterizados da seguinte forma: velocidade curvilínea média (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), retilinearidade ($STR = VSL/VAP$), linearidade ($LIN = VSL/VCL$), porcentagens de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e frequência de batimento flagelar (BCF). O que estas características específicas da motilidade nos dizem sobre a qualidade do sêmen de garanhões fresco ou congelado é pouco clara, visto que não estão definidos valores padrão para movimentos de espermatozoides normais ou anormais e nem há uma normalização internacional de configurações do equipamento (Katila, 2001).

Na análise de sêmen congelado, partículas que não são espermatozoides (por exemplo a gema de ovo) podem ser erroneamente identificadas como espermatozoides, causando superestimação da concentração de espermatozoides e subestimação da proporção de espermatozoides móveis (Comhaire et al., 1992). A concentração máxima de espermatozoides que pode ser lida pelo CASA é usualmente de 50×10^6 spz/mL, contudo uma diluição de 25×10^6 spz/mL tem sido recomendada (Varner et al., 1991).

Palmer e Magistrini (1992) inseminaram 766 éguas com sêmen congelado avaliado pelo CASA, mas nenhum dos critérios medidos (VCL, LIN, ALH, MOT, RAP) teve uma correlação significativa com a fertilidade. Até o momento, a superioridade da análise automática na avaliação de sêmen congelado não foi comprovada, embora seja esta a única maneira de se avaliar com precisão a velocidade e linearidade (Katila, 2001).

Morfologia espermática e integridade de membrana

Em alguns estudos, o aumento das anormalidades dos espermatozoides foi associado com a redução da fertilidade (Bielański 1975, Jasko et al. 1990a), mas outros não encontraram nenhuma relação entre a morfologia do sêmen fresco e a fertilidade (Voss et al. 1981, Dowsett & Pattie 1982). Uma ampla gama de desvios morfológicos pode ser aceita para garanhões reprodutores, se o número total de espermatozoides móveis morfológicamente normais no ejaculado for adequado (Kenney et al., 1983). Às vezes, as baixas taxas de prenhez pós-inseminação com sêmen congelado são devidas ao pequeno número de espermatozoides vivos morfológicamente normais. Após o congelamento e descongelamento, mudanças ultraestruturais são observadas no acrossoma, nas fibras externas da peça intermediária e no axonema da peça principal (Christensen et al, 1995).

Entre todos os exames, o uso de corantes fluorescentes em conjunto com a citometria de fluxo permite avaliar vários parâmetros espermáticos simultaneamente de milhares de espermatozoides em um curto período de tempo (Zeginiadou et al., 2000; Rathi et al., 2001). Estas avaliações favorecem a predição da fertilidade potencial de um determinado animal e avaliam com mais acurácia a congelabilidade do sêmen de um garanhão (Magistrini, 2000). A membrana plasmática do espermatozoide envolve toda a célula e desempenha diversas funções importantes na fisiologia da célula. Se a membrana plasmática do espermatozoide não estiver funcionalmente intacta este será considerado inviável. Normalmente, a integridade

física da membrana é avaliada depois da marcação das células com corantes fluorescentes não penetrantes.

Uma combinação de duas sondas fluorescentes, como a carboxifluoresceínadiacetato (CFDA) e o iodeto de propídio (IP), pode ser utilizada para avaliar a viabilidade celular. As moléculas de CFDA atravessam as membranas e são de-esterificadas por esterases no interior da célula. Elas são retidas no interior intacto das células, levando-as à fluorescência verde. Já as moléculas de IP não podem penetrar em células com membrana íntegra, podendo apenas se ligar e corar o DNA de células danificadas, dando-lhes fluorescência vermelha (Malmgren, 1997).

O método mais comumente utilizado para detectar a integridade acrossômica é a coloração com conjugados de fluoresceína-lectina, tais como a aglutinina do amendoim *Peanut agglutinin* (PNA), a aglutinina da ervilha *Pisum sativum agglutinin* (PSA) ou a concanavalina A (ConA) acoplados com o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Magistrini et al. 1997). Espermatozoides com acrossoma intacto apresentam intensa fluorescência verde sobre a capa acrossomal, enquanto espermatozoides reagidos mostram uma imagem de fluorescência desigual e interrompida. As células espermáticas que completam a reação acrossômica adquirem uma fluorescência no segmento equatorial ou permanecem não coradas (Cheng et al., 1996). Kneissl (1993) encontrou alta correlação entre a motilidade total avaliada computadorizadamente (Strömberg-Mika-Cell-Motion-Analysis-System) e a porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra corados com CFDA e IP. A citometria de fluxo demonstrou ser uma ferramenta valiosa para discriminar as respostas de diferentes subpopulações de espermatozoides as condições de capacitação (Ricker et al, 2006). A avaliação por citometria de fluxo do sêmen congelado de 5 garanhões com o auxílio do corante IP obteve correlação significativa com a fertilidade ($r = 0,68$) em 40 éguas e foi superior a análise por outros métodos (MT, penetração oócito de hamster) (Wilhelm et al, 1996)

Teste hiposmótico (HOST)

Quando os espermatozoides são suspensos em uma solução hiposmótica, a água penetra na célula, numa tentativa de atingir o equilíbrio osmótico. Isto conseqüentemente aumenta o volume da célula, reduzindo o comprimento inicial do flagelo e as protuberâncias da membrana plasmática (Drevius & Eriksson 1966). A entrada de água ocorre apenas na região da cauda, visto que é onde a membrana é mais frouxamente aderida, criando diferentes tipos de dobras. O aparecimento de uma dobra na cauda do espermatozoide é um sinal de que a água foi transportada de maneira fisiológica para dentro da célula de modo a atingir o equilíbrio osmótico. Isto indica que a membrana flagelar está intacta (Colenbrander et al, 1992). Quando o espermatozoide não suporta mais o estresse osmótico, a membrana plasmática se rompe e ocorre desespiralização da cauda (Jeyendran et al., 1984). São nestes princípios que se baseia o teste hiposmótico. O teste hiposmótico foi desenvolvido para a avaliação do sêmen de humanos, utilizando-se uma solução a 150mOsm/L contendo citrato de sódio e lactose (Jeyendran et al., 1984). A avaliação da funcionalidade da membrana plasmática do espermatozoide pode ser realizada com o teste hiposmótico utilizando como solução hiposmótica a água destilada (Lomeo e Giambersio, 1991). Este teste foi modificado por Lagares et al. (2000) para avaliação do sêmen equino. Nesta avaliação, uma alíquota de 100 μ L de sêmen é adicionada a 200 μ L (diluição 1:2) de água destilada, ambos a 37°C, seguido de incubação em banho-maria a 37°C por 5 min. Após este período, as amostras são

analisadas em microscopia de contraste de fase (400x) e 200 células são avaliadas. O percentual de espermatozoides que reagiram positivamente ao teste hiposmótico é calculado por meio de observação da porcentagem de espermatozoides com cauda enrolada, subtraído o existente anteriormente quando da exposição do espermatozoide ao meio hiposmótico. Lagares (1995) testou 156 ejaculados de 13 garanhões, observando uma correlação positiva entre o teste hiposmótico e a taxa de fertilidade.

Interação espermatozoide-oócito: ensaio de ligação à zona pelúcida (ZBA)

Em todas as espécies, a penetração do oócito pelos espermatozoides requer que o mesmo possua motilidade, proteínas receptoras intactas para que o espermatozoide possa se ligar a zona pelúcida, além da capacidade de sofrer a reação acrossômica e de se ligar à membrana plasmática do oócito. Diferentes ensaios de penetração de oócito *in vitro* foram desenvolvidos a fim de analisar cada um desses atributos (Graham, 1997).

A ligação do espermatozoide com a zona pelúcida (ZP) desempenha um papel crucial no processo de fertilização. Na tuba uterina, o espermatozoide penetra a massa circundante de células do cumulus do oócito e se liga à ZP, a última barreira física que o espermatozoide deve superar antes da fertilização. A incapacidade do espermatozoide em penetrar a ZP resulta inevitavelmente em infertilidade (Green, 1997). Yanagimachi et al. (1979) demonstraram que o armazenamento de oócitos de diversas espécies em soluções salinas hiperconcentradas conserva várias características físicas e químicas da ZP. Além disso, Fazeli et al. (1995) demonstraram uma relação entre a taxa de ligação a ZP de oócitos armazenados em soluções salinas e a fertilidade do garanhão. No entanto, na espécie equina, os ensaios de ligação a ZP têm sido limitados devido à escassez de oócitos equinos. Coutinho da Silva e colaboradores (2012) mostraram que o uso de ZP bovina é adequado para ensaios de ligação com o espermatozoide equino.

Diante do exposto, neste trabalho testamos a hipótese de que o uso de antioxidantes no processo de criopreservação do sêmen equino poderia reduzir os efeitos deletérios do estresse oxidativo sobre o espermatozoide e, conseqüentemente aumentar as taxas de capacitação e hiperativação espermática induzidas no protocolo de fertilização *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta do sêmen

Foi utilizado um ejaculado de seis garanhões (n=6) clinicamente normais, com idade compreendida entre 4 e 8 anos, localizados nas cidades de Montes Claros, Janaúba, Inhaúma e Conselheiro Lafaiete/MG, nos meses de julho a setembro de 2014. Os animais foram selecionados a partir de exame andrológico e do histórico reprodutivo. As coletas de sêmen foram realizadas com vagina artificial modelo “Hannover”. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi filtrado para a retirada da fração gel e avaliado quanto à motilidade total, progressiva, vigor, concentração e morfologia espermáticas. Uma amostra do ejaculado foi congelada para posteriores análises de radicais livres.

4.2. Avaliação do sêmen fresco

O sêmen fresco foi avaliado quanto à motilidade espermática progressiva, total, e vigor com o auxílio de um microscópio de campo claro (100x). Foram utilizados neste experimento apenas ejaculados com motilidade progressiva igual ou superior a 50% e vigor igual ou superior a 3. O cálculo da concentração espermática foi realizado através da contagem de espermatozoides em câmara hemocitométrica. A morfologia espermática foi avaliada através da técnica de preparação úmida (Mies Filho, 1975). O sêmen foi preservado em solução de formol salina tamponada e 100 espermatozoides foram avaliados com auxílio de microscopia de contraste de fase (1000x). Foram utilizados somente ejaculados com porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais maior ou igual a 70% (CBRA, 1998).

4.3. Parte1: Avaliação da qualidade espermática pós-descongelamento com diferentes diluidores contendo antioxidantes

4.3.1. Congelamento do sêmen

O sêmen foi diluído na proporção de 1:1 com diluidor de Kenney et al. (1975) e centrifugado (400xg, 10 min). O sobrenadante foi descartado de modo a se deixar 10% do centrifugado. Após homogeneização, o sêmen foi distribuído em 3 grupos e ressuspenso para se obter 100×10^6 esp./mL de acordo com os 3 meios de congelamento: 1) INRA 82 (Controle; Vidament et al, 1997), 2) INRA 82 suplementado com lactoferrina (500 μ g/mL, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA), 3) INRA 82 suplementado com catalase (200UI/mL, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA). O sêmen ressuspenso foi avaliado quanto à motilidade total, progressiva e vigor espermáticos. As amostras de sêmen foram envasadas em palhetas de 0,5ml, seladas e imediatamente resfriadas com uma curva de 0,27°C/min até a temperatura de 5°C. Posteriormente, as palhetas foram dispostas a 2,5cm acima do nitrogênio líquido e após 20 min., imersas neste (-196°C), sendo armazenadas em butijões de nitrogênio líquido.

4.3.2. Avaliação espermática pós-descongelamento

4.3.3. Análise da motilidade espermática computadorizada (CASA)

Uma amostra de sêmen de cada tratamento foi descongelada a 37°C por 30 segundos em banho-maria e uma alíquota de 5 μ L foi avaliada por análise computadorizada no aparelho CASA (Sperm Class Analyser, SCA® 2005 VS 4.0.0 Microptik S.L., Barcelona, Espanha) quanto a motilidade total, progressiva, velocidade curvilínea (VCL- μ m/s), velocidade média da trajetória (VAP- μ m/s), velocidade linear progressiva (VSL- μ m/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH- μ m), frequência de batimento cruzado (BCF-Hz), retilinearidade (STR-%), linearidade (LIN-%) e oscilação (WOB- %). Foram analisados 9 campos/gota.

4.3.4. Avaliação da funcionalidade espermática

A porcentagem de espermatozoides com membrana funcional foi avaliada por meio do teste hiposmótico com água destilada (Lomeo e Giambersio, 1991) modificado por Lagares et al. (2000) na diluição 1:2 (sêmen: água destilada). Uma alíquota de 100 μ L de sêmen foi adicionada a 200 μ L de água destilada, ambos a 37°C, seguido de incubação em banho-maria a 37°C por cinco minutos. Após incubação, as amostras foram analisadas em microscopia de

contraste de fase (400x), com avaliação de 200 células por amostra. O percentual de espermatozoides que reagiram positivamente ao teste hiposmótico com cauda enrolada foi calculado descontando-se a porcentagem de espermatozoides com cauda enrolada encontrada no exame morfológico.

4.3.5. Avaliação da integridade de membranas espermáticas

A integridade das membranas plasmática e acrossomal foi verificada com auxílio de citometria de fluxo, através dos corantes fluorescentes Iodeto de Propídeo (IP, Sigma P4170, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) e Isoticianato de fluoresceína- *Peanut agglutinin* (FITC-PNA, Sigma L7381, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA). As amostras de sêmen descongeladas foram diluídas 1:20 em PBS (250 μ L de sêmen:5 mL de PBS). Uma alíquota de 200 μ L dessa suspensão foi corada com FITC –PNA (1,125 μ g/mL) e incubada por 10 min. em banho-maria a 37°C. Posteriormente as amostras foram diluídas acrescentando-se 1mL de PBS, coradas com IP (1,5 mM) e incubadas por 10 min. em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas à leitura no citômetro de fluxo (FACScan, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Dez mil eventos, a uma taxa de 500 células/seg., foram analisados por amostra.

4.3.6. Mensuração da concentração de espécies reativas ao oxigênio

O efeito antioxidante foi avaliado através da mensuração dos níveis de nitrito (NO) e peróxido de hidrogênio (μ M/ μ g de proteína) utilizando a espectrofotometria com composto de DAN (Misko et al, 1993) e dosagem pelo método FOX 2 modificado (Nourooz-Zadeh, 1994), respectivamente. A técnica de determinação de nitrito por fluorescência baseia-se na reação do NO (metabólito do óxido nítrico) com o composto não-fluorescente 2,3-diaminonaphthalene (DAN) em meio ácido, originando o produto fluorescente 1-(H)-naphthotriazole. Para tal, 150 μ L da amostra de sêmen descongelado (37°C, 30seg) foi adicionada a um poço de microplaca com 150 μ L de água destilada, onde foi acrescentado 10 μ L da solução de DAN (0,05mg de DAN solubilizado em 1mL de HCl 0,62M-0,05mg/mL). A microplaca foi mantida ao abrigo de luz durante 10 min. A reação foi finalizada com 5 μ L de NaOH 2,8M. Para preparação do padrão os passos anteriores foram repetidos com a substituição do sêmen por concentrações conhecidas de NaNO₂. A emissão de fluorescência foi medida a 415nm, com excitação a 365nm no espectrofluorímetro. Os resultados foram expressos em concentração de nitrito calculada a partir da equação da reta obtida com os padrões de nitrito.

Para mensuração do hidróperóxido (H₂O₂) foi utilizada a técnica espectrofotométrica de FOX-2 modificada (oxidação ferrosa do xilenol Orange, versão 2). Essa técnica consiste na oxidação de íons ferrosos (Fe²⁺) a íons férricos (Fe³⁺) sob condições ácidas, pelos hidróperóxidos lipídicos. O indicador utilizado é o xilenol Orange, que reage com os íons Fe³⁺ produzindo um cromóforo azul-arroxeadado com coeficiente de extinção 4,3x10⁴M⁻¹cm⁻¹, a 560nm. Para tal, preparou-se o reagente de FOX no momento da análise e este foi mantido ao abrigo de luz durante todo o experimento. Em um microtubo de 0,5mL, foi adicionado 450 μ L do reagente de FOX a 50 μ L da amostra de sêmen descongelado (37°C, 30seg) e após 30 min, a amostra foi centrifugada (300xg, 15seg). O branco foi feito com 450 μ L do reagente de FOX adicionado de 50 μ L de água destilada. Duzentos microlitros das amostras e do branco (duplicata) foram pipetados para uma microplaca a qual foi submetida à leitura em

espectrofotômetro a 560nm. O cálculo da concentração de hidroperóxido/H₂O₂ nas amostras foi realizado de acordo com o coeficiente de extinção molar dos hidroperóxidos. Logo: $A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} C$, onde A_{λ} =absorbância a 560nm; ϵ_{λ} = coeficiente de extinção molar do cromóforo; C= concentração de hidroperóxidos (mol/mL).

4.3.7. Mensuração da concentração de ferro livre

A bioatividade da lactoferrina foi avaliada através da concentração de ferro livre presente nas amostras de sêmen descongelado. Deste modo, procedeu-se a análise das amostras através de espectrofotometria automatizada empregando-se kit comercial (SYNERMED®-Synermed International Inc), com o auxílio do equipamento COBAS MIRA PLUS® (Roche, Corp., Basel, Schweiz).

4.4. Parte2: Avaliação da capacidade fecundante do espermatozoide equino submetido a diferentes protocolos de capacitação e hiperativação

4.4.1. Seleção espermática e indução da hiperativação

As palhetas criopreservadas foram descongeladas a 37°C por 30 seg e avaliadas quanto à motilidade e vigor sob microscopia de campo claro. Para seleção dos espermatozoides móveis, foi realizado o método *swim-up*. Uma palheta de cada tratamento foi distribuída em 2 tubos de 4mL contendo 1mL de meio Whittens modificado capacitante (pH=8,5), de forma que 250µL de sêmen foi depositado no fundo de cada tubo. Posteriormente, os tubos foram incubados por 20 min em estufa a 38,2°C com 5% de CO₂ para que os espermatozoides móveis migrassem para cima no meio. Em seguida, retirou-se 750µL do sobrenadante de cada tubo, o qual foi depositado em tubos cônicos. Procedeu-se a centrifugação do sobrenadante a 500xg por 7min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado deixando-se de 75-90µL de sedimento, o qual foi distribuído em 3 alíquotas de 25-30µL. As alíquotas foram ressuspendidas com o mesmo volume (25-30µL) de meio Whittens modificado capacitante suplementado com os indutores de hiperativação de acordo com os seguintes tratamentos **Capacitado controle:** Meio Whittens modificado capacitante, **Procaína:** Meio Whittens modificado capacitante suplementado com 5mM cloridrato de procaína (Procaine hydrochloride; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e **Cálcio ionóforo:** Meio Whittens modificado capacitante suplementado com 5µM cálcio ionóforo A23187 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). As amostras foram então incubadas por 10 min a 37°C. Em seguida, foi calculada a concentração espermática/mL com o auxílio de uma câmara hemocitométrica. A partir deste resultado, as amostras foram diluídas com meio Whittens capacitante até uma concentração final de 10x10⁶/mL de forma a reduzir a concentração de indutores de capacitação e se obter a concentração de espermatozoides a ser utilizada nas análises (Figura 8).

4.4.2. Análise dos parâmetros de motilidade com o sistema de avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA) após indução da capacitação/hiperativação

Após a preparação do sêmen para indução da hiperativação, a motilidade espermática foi analisada utilizando-se o aparelho CASA após a centrifugação pós-*swim-up* (Grupo: pós-*swim-up* capacitado), após 10 min de incubação em meio Whittens de capacitação (Grupo:

capacitação controle) e de hiperativação com a Procaina e o CaI (Grupos: Hiperativ. Proc e Hiperativ. CaI, respectivamente) contendo 10×10^6 esp/ml (Fig. 8.) Foram avaliados 7 parâmetros: velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH- μm), frequência de batimento cruzado (BCF- Hz), retilinearidade (STR- %) e linearidade (LIN- %).

4.4.3. Análise da integridade de membranas espermáticas e reação acrossômica após indução da capacitação/hiperativação

Após a preparação do sêmen para indução da hiperativação, as avaliações de integridade de membrana plasmática e acrossoma dos espermatozoides foram realizadas com citometria de fluxo utilizando-se as colorações Iodeto de Propídeo (IP) e FITC/PNA. Para análise da reação acrossômica após os protocolos de hiperativação, as amostras foram coradas após a ressuspensão para 10×10^6 sptz/mL (aproximadamente 30 μl). Foram adicionados às suspensões 15 μL da solução trabalho de FITC/PNA (75 $\mu\text{g/mL}$) e incubados em banho maria a 37°C por 10 min. Posteriormente, as amostras foram diluídas com 1 mL de PBS, coradas com 15 μL de Iodeto de Propídeo (1,5 mM), incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e submetidas à leitura no citômetro de fluxo (FACScan, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Cinquenta mil eventos, a uma taxa de 1000 células/seg foram analisados por amostra. Os dados correspondentes à fluorescência vermelha (IP-FL3 fotodetector) e verde (FITC/PNA-FL1 fotodetector) dos espermatozoides foram contabilizados. Os espermatozoides que fluoresceram de vermelho (IP+) foram classificados como não viáveis e os que fluoresceram de verde (PNA+), como acrossoma reagido. Foram considerados espermatozoides viáveis aqueles que não fluoresceram de vermelho e nem de verde (IP-/PNA-), e com reação acrossômica verdadeira os espermatozoides IP- (viáveis) com região acrossômica verde fluorescente (PNA+).

4.4.4. Preparação de oócitos para o ensaio de ligação à zona pelúcida bovina

Para o ensaio de ligação de espermatozoides equinos à zona pelúcida de oócitos bovinos, ovários bovinos foram obtidos em abatedouros locais e transportados ao laboratório em solução salina 0,9% aquecida a 37°C dentro de 2 h após a coleta. Todos os folículos visíveis foram aspirados com o auxílio de uma agulha de 20G e os oócitos rastreados em meio M199 com sais de Hanks suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) com auxílio de um estereomicroscópio. Para a remoção das células do cummulus dos oócitos foi realizado vortex por 2 min e as células restantes foram removidas com pipetagem contínua através de Pipeta Pasteur com ponta fina.

Os oócitos foram lavados quatro vezes em M199 com sais de Hanks+ 10%SFB, armazenados em gotas de solução hiperosmótica de MgCl_2 (1,5M MgCl_2 , 40mM HEPES, 0,1%SFB) sob óleo mineral e mantidos a 5°C até o uso (Yanagimachi et al, 1979).

4.4.5. Preparação do sêmen para o ensaio de ligação espermática à zona pelúcida (ZBA) bovina

Para preparação do sêmen para o ZBA bovina, foi realizada a seleção espermática pelo método de *swim-up*, sendo que após a centrifugação do semen, o sedimento (75-90 μL) foi distribuído em 3 tubos constituindo: **1) Grupo Capacitado Controle:** 30 μL de meio

Whittens modificado capacitante + 35µg/mL de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA); 2) **Grupo Hiperativado Procaína**: 30 µL de meio Whittens modificado capacitante + 5mM de Procaína + 35 µg/mL de Hoechst, e 3) **Grupo Hiperativado Cálcio Ionóforo**: 30 µL de meio Whittens modificado capacitante + 5 µM de Cálcio ionóforo + 35 µg/mL de Hoechst (Fig.8). Após incubação (10 min, 37°C), as amostras foram ressuspensas com meio Whittens capacitante de forma a se obter a concentração de 2×10^6 espermatozoides/mL. O grupo controle para o ZBA bovina foi considerado o **Grupo não capacitado** (Fig.8). Este foi obtido a partir da seleção dos espermatozoides pelo método *swim-up* (1 palheta de sêmen) em meio Whittens não-capacitante. O sobrenadante foi centrifugado, e o sedimento foi ressuspensado em meio Whittens não capacitante (75-90µL) com 35 µg/mL de Hoechst. Após incubação (10 min, 37°C), a amostra foi ressuspensada com meio Whittens não capacitante para se obter uma concentração final de 2×10^6 espermatozoides/mL para o ZBA.

4.4.6. Ensaio de ligação de espermatozoides equinos à zona pelúcida de oócito (ZBA) bovino

Para ZBA, os oócitos armazenados foram lavados quatro vezes em meio de Hanks +10%SFB e incubados em meio M199 com sais de Earle +10%SFB, previamente equilibrado, em incubadora a 38,5°C com 5% de CO₂ por 1 hora. Os oócitos foram aleatoriamente depositados em gotas de 45µL de sais de Earle +10%SFB (5 oócitos/grupo) cobertas com óleo mineral. Um volume de 5µL de sêmen ressuspensado para concentração de 2×10^6 sptz/mL (Coutinho da Silva et al, 2012), conforme os tratamentos descritos anteriormente, foi adicionado à gota de 45µL contendo os oócitos. Estes foram inseminados e incubados por 2 horas a 38,5°C em atmosfera umidificada de 5% de CO₂. Após a incubação, os oócitos foram vigorosamente lavados em 4 gotas de M199 com sais de Earle +10%SFB com uma pipeta de Pasteur com ponta fina, a fim de remover os espermatozoides não firmemente aderidos. Os oócitos foram dispostos em lâmina, com um anel de vaselina em pasta para dar suporte à lamínula e o número de espermatozoides aderidos a zona pelúcida (ZP) foi observado com um microscópio de epifluorescência (filtros 360/340nm de excitação e 460/450nm de emissão, 400x, Olympus, Center Valley, Pennsylvania, USA).

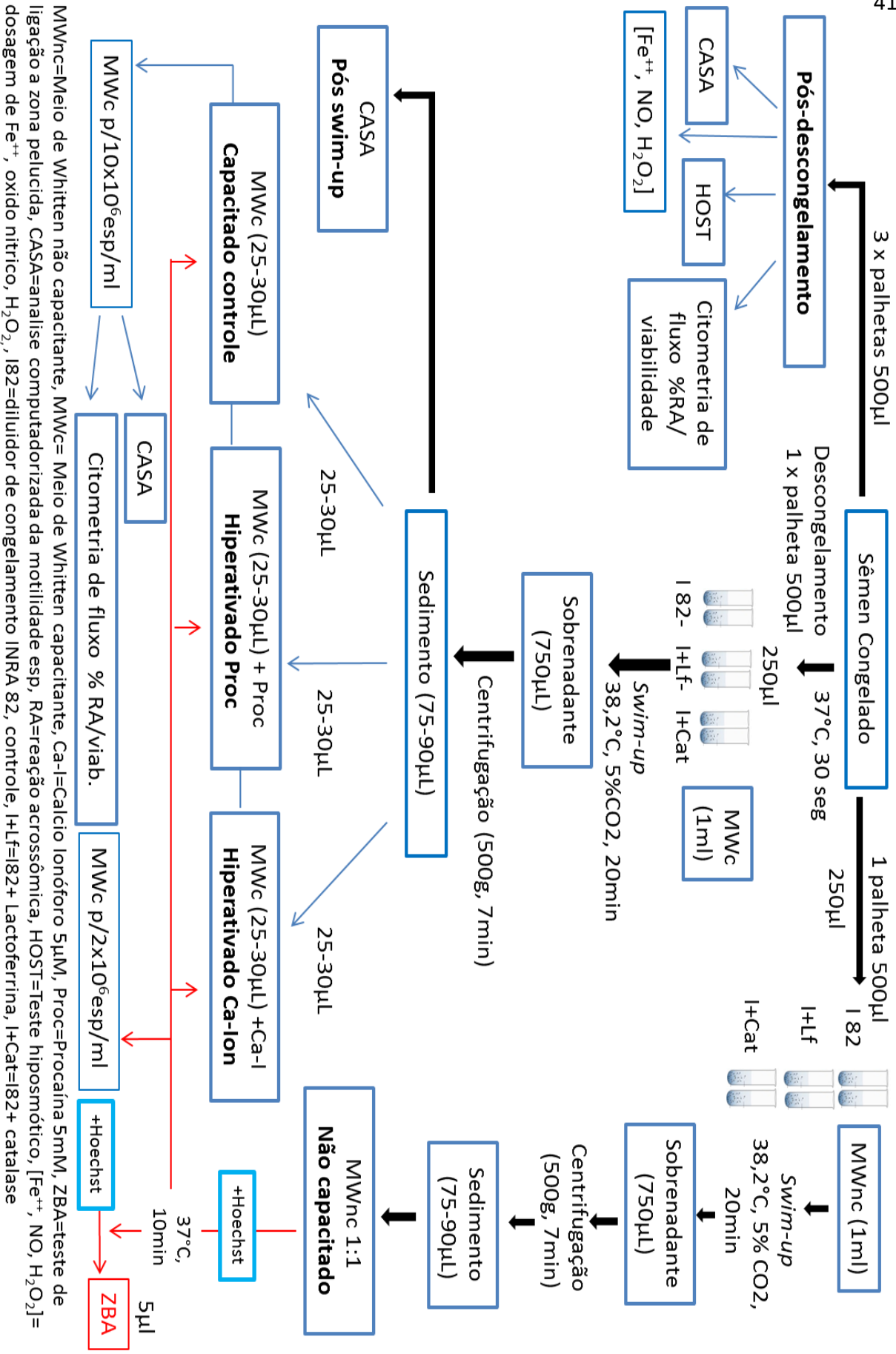


Figura 8: Esquema representativo do protocolo de preparação do sêmen para as análises no CASA, citômetro de fluxo e para o ZBA.

4.5. Análise estatística

Para a avaliação do efeito dos antioxidantes foi utilizado o delineamento experimental em blocos ao acaso, considerando o ganhão como bloco. Os cálculos de média, desvio padrão e análise de variância foram realizados conforme Sampaio (2002). As médias obtidas para os diferentes parâmetros foram comparadas pelos testes: 1) MT e MP pós-descongelamento, VAP, VCL, VSL, BCF, STR, LIN, WOB, porcentagem de espermatozoides íntegros após o teste hiposmótico, porcentagem de espermatozoides com acrossoma espontaneamente reagido, dosagem de ferro, nitrito e peróxido de hidrogênio apresentaram distribuição normal e as médias foram comparadas pelo teste Tukey, 2) ALH não apresentou distribuição normal e foi analisada como variável não paramétrica pelo teste de Friedman, e 3) MT, MP e vigor pós-diluição- variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Friedman. Os dados foram analisados com o programa SAS (Statistical Analysis System), com uma probabilidade de $P < 0.05$ sendo considerada significativa.

Após os protocolos de capacitação e hiperativação foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados (repetição como bloco). Os cálculos de média, desvio padrão e análise de variância foram realizados conforme Sampaio (2002). As médias obtidas para os diferentes parâmetros foram comparados pelos testes: 1) Número de espermatozoides ligados à zona pelúcida (ZBA), visto que os dados não apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, foram transformados utilizando-se raiz quadrada e analisados por ANOVA com teste de Tukey; 2) Porcentagem de células viáveis: apresentou distribuição normal e foi avaliada com análise de variância pelo teste de Tukey, 3) Porcentagem de espermatozoides que sofreram reação acrossômica não apresentou distribuição normal e homocedasticidade e, portanto, foram transformadas utilizando-se raiz quadrada e analisados por ANOVA com teste de Tukey, 4) Características espermáticas relacionadas aos parâmetros de motilidade VCL, VSL, VAP, LIN, STR não apresentaram distribuição normal e homocedasticidade e foram transformadas utilizando-se raiz quadrada e analisadas por ANOVA com teste de Tukey e Scott-Knott, 5) Características espermáticas relacionadas aos parâmetros de motilidade ALH e BCF não apresentaram distribuição normal e foram analisadas como variáveis não paramétricas pelo teste de Friedman. Os dados foram analisados usando o programa SAS (Statistical Analysis System), com uma probabilidade de $P < 0,05$ sendo considerada significativa.

5. RESULTADOS

5.1. Parte1: Avaliação da qualidade espermática pós-descongelamento com diferentes diluidores contendo antioxidantes

Os parâmetros de avaliação do sêmen fresco do ejaculado dos 6 garanhões utilizados no presente experimento foram descritos na Tabela 1. Após a coleta, os ejaculados apresentaram motilidade total variando de 80 a 90%, motilidade progressiva de 50 a 70% e vigor espermático entre 3 e 4, estando os valores dentro do aceitável para criopreservação. A concentração espermática variou de 165×10^6 a $467,5 \times 10^6$ esp./mL e o número total de espermatozoides no ejaculado de $5,5 \times 10^9$ a $33,9 \times 10^9$. O número de espermatozoides morfológicamente normais no ejaculado (72,6% a 85,8%) apresentou-se dentro da normalidade para o sêmen equino (>70%).

Tabela 1: Características de avaliação do sêmen fresco (n=6).

Garanhão	MT (%)	MP (%)	Vigor (0-5)	Volume (mL)	Nº Total	Conc./mL	Morf. (%)
1	80	50	3-4	120	$33,9 \times 10^9$	$282,5 \times 10^6$	75,2
2	80	50	3	30	$6,7 \times 10^9$	$222,5 \times 10^6$	81,7
3	80	60	3-4	75	$12,4 \times 10^9$	165×10^6	85,8
4	80	50	3-4	18	$7,5 \times 10^9$	420×10^6	80,0
5	80	60	3-4	20	$5,5 \times 10^9$	$277,5 \times 10^6$	72,6
6	90	70	4	30	$14,0 \times 10^9$	$467,5 \times 10^6$	76,9
Média	81,6	56,6	3,5	48,8	$13,3 \times 10^9$	$305,8 \times 10^6$	78,7

MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; Nº total: número total de espermatozoides no ejaculado; Conc./mL: concentração espermática/mL; Morf.: porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais.

A porcentagem de espermatozoides com motilidade total, progressiva e vigor após a diluição com os meios testados não diferiu estatisticamente ($P > 0,05$, Tab. 2). Da mesma forma, após o descongelamento, as amostras avaliadas pelo CASA não diferiram entre os tratamentos quanto aos parâmetros motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), frequência de batimento cruzado (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), índice de oscilação (WOB) e deslocamento lateral de cabeça (ALH, $P > 0,05$, Tab. 3).

Tabela 2: Percentual de espermatozoides com motilidade total, progressiva e vigor após diluição do sêmen fresco (mediana; mínimo-máximo).

Tratamento	n	Motilidade Total (%)	Motilidade Progressiva (%)	Vigor (1-5)
INRA 82	6	80 (70-80) ^a	60 (50-70) ^a	3,5 (3-4) ^a
INRA 82 + Lf	6	80 (70-80) ^a	60 (50-60) ^a	3,5 (3-4) ^a
INRA 82 + Cat	6	80 (70-85) ^a	60 (50-70) ^a	3,5 (3-4) ^a

Lf: Lactoferrina; Cat: catalase. Os valores não diferiram estatisticamente (P >0,05)

Tabela 3: Parâmetros espermáticos avaliados pelo CASA pós-descongelamento (média± desvio padrão), e amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) do espermatozoide (mediana; mínimo-máximo).

Trat.	MT (%)	MP (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	WO B (%)	ALH (µm)
I 82	48,2± 28,2 ^a	14,1± 11,4 ^a	30,7± 6,9 ^a	24,5± 5,7 ^a	39,1± 7,6 ^a	8,1± 0,7 ^a	79,7 ± 4,3 _a	62,3 ± 6,3 _a	78,1 ± 4,4 _a	2,1 (1,7-2,4) _a
I+Lf	54,9± 12,0 ^a	17,3± 6,2 ^a	33,8± 7,2 ^a	27,5± 7,3 ^a	42,1± 5,8 ^a	8,0± 0,8 ^a	80,6 ± 4,5 _a	64,4 ± 8,6 _a	79,6 ± 6,5 _a	2,0 (1,6-2,3) _a
I+Ca t	47,3± 28,1 ^a	16,7± 9,4 ^a	35,7± 6,7 ^a	28,8± 6,5 ^a	44,1± 7,1 ^a	7,7± 1,0 ^a	80,5 ± 6,2 _a	65,3 ± 9,7 _a	80,8 ± 6,5 _a	1,7 (1,5-2,4) _a

I82=INRA 82, Lf: lactoferrina; Cat: catalase; MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VAP: velocidade média da trajetória; VSL: velocidade linear progressiva; VCL: velocidade curvilínea; BCF: frequência de batimento cruzado; STR: retilinearidade; LIN: linearidade; WOB: índice de oscilação, Trat=tratamentos. Os valores não diferiram estatisticamente (P >0,05).

Houve um maior percentual de espermatozoides com membrana funcional no grupo com Lf comparado ao grupo controle, embora não tenha diferido do grupo com suplementação de Cat. (Tab. 4). Não houve diferença significativa da taxa de espermatozoides com membrana íntegra, com reação acrossômica espontânea e nem quanto ao número de espermatozoides ligados a ZP bovina, entre os diluidores testados.

Tabela 4: Percentual de espermatozoides com membranas íntegras (IP negativo, citometria de fluxo), funcionais (teste hiposmótico), com reação acrossômica (IP negativo e PNA positivo, citometria de fluxo) pós-descongelamento, e número de espermatozoides ligados a ZP bovina. (média± desvio padrão).

Trat.	n	M funcional (%)	M íntegra (%)	RA espontânea (%)	n	N° esp. ligados a ZP
I 82	6	37,6±15,6 _b	24,1±15,8 ^a	1,5±1,0 ^a	2	3,8±3,3 ^a
					4	
I+Lf	6	50,7±11,6 _a	37,7±8,3 ^a	0,9±0,4 ^a	2	4,8±3,3 ^a
					4	
I+Ca	6	39,6±13,9 _{ab}	28,3±14,0 ^a	0,9±0,2 ^a	2	4,1±3,8 ^a
t					4	

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$), Lf: lactoferrina, Cat: catalase, I82=INRA82, IP: iodeto de propídio, M: membrana espermática, RA= Reação acrossômica, cap=capacitação, hiper=hiperativação, Trat=tratamentos

A bioatividade da Lf foi avaliada utilizando-se a mensuração do ferro livre no sêmen após o descongelamento. O tratamento com a Lf obteve concentrações de ferro livre inferiores aos demais grupos ($P < 0,05$, Tab. 5). Com relação à atividade antioxidante, foram mensuradas as concentrações do metabólito nitrito (NO), como medida da produção de óxido nítrico, e de peróxido de hidrogênio. Não houve diferença significativa entre a produção de NO e H_2O_2 entre os tratamentos ($P > 0,05$, Tab.5).

Tabela 5: Concentrações de ferro, nitrito e peróxido de hidrogênio no sêmen pós-descongelamento (média± desvio padrão).

Tratamentos	Ferro (mg/dL)	Nitrito ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína)	Peróxido ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína)
Fresco	-	39,1±36,5 ^a	47,5±27,8 ^a
INRA 82	73,3±13,8 ^a	25,9±4,2 ^a	49,3±7,4 ^a
INRA 82 + Lf	61,4±11,6 ^b	16,3±7,1 ^a	41,2±13,0 ^a
INRA 82 + Cat	75,6±13,4 ^a	25,3±9,2 ^a	46,3±6,9 ^a

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$), Lf: lactoferrina; Cat: catalase

5.2. Parte 2: Avaliação da capacidade fecundante do espermatozoide equino submetido a diferentes protocolos de capacitação e hiperativação

Visto que não houve interação entre os tratamentos de capacitação e hiperativação com os diluidores testados, foi avaliada a capacidade fecundante dos espermatozoides submetidos a diferentes protocolos de capacitação/hiperativação independente dos diluidores. Os espermatozoides foram avaliados quanto às características de motilidade (CASA), taxa de

espermatozoides com membrana íntegra (IP) e com reação acrossômica (IP/PNA, citometria de fluxo), número de espermatozoides ligados a ZP bovina (ZBA), após os protocolos de capacitação/hiperativação.

5.3. Características de motilidade espermática como indicação de hiperativação

A avaliação computadorizada dos parâmetros de motilidade pelo CASA foi utilizada como indicação de hiperativação espermática pelos protocolos testados. Foram avaliados os parâmetros de motilidade espermática VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH e BCF (Tabela 6). A velocidade curvilínea (VCL), VSL e VAP do espermatozoide foram maiores após o *swim-up* do que após os protocolos de hiperativação com procaína e cálcio ionóforo. Os grupos pós *swim-up* e capacitado controle não diferiram quanto aos parâmetros VCL, VSL, VAP, LIN e STR ($P>0,05$). A hiperativação com procaína obteve os menores valores de linearidade (LIN, $P<0,05$), enquanto que a retilinearidade (STR) foi estatisticamente semelhante para todos os grupos. A ALH e BCF foram maiores no pós-descongelamento do que nos grupos capacitado controle e hiperativados ($P<0,05$). No entanto, o grupo hiperativado com a Procaína não diferiu do capacitado controle e nem do hiperativado com o Calcio ionóforo ($p>0,05$).

Tabela 6: Parâmetros de motilidades dos espermatozoides avaliados com o CASA após os protocolos de capacitação e hiperativação (média±desvio padrão).

Tratamento	n	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Pós <i>swim-up</i>	1	40,6±11,	13,2±4,6	24,3±9,0 ^a	32,2±7,0 ^a	55,5±9,9 ^a	1,9±1,2	4,7±2,8
	8	1 ^a	a				a	a
Capcitado controle	1	32,9±17,	12,4±6,5	21,8±13,	38,5±8,9 ^a	60,8±13,	0,7±0,8	2,1±2,0
	8	9 ^{ab}	a	4 ^a		2 ^a	b	b
Hiperativado Proc.	1	22,1±8,2 ^b	4,6±2,1 ^b	9,1±3,7 ^b	21,6±7,7 ^b	51,8±14,	0,4±0,7	1,1±1,8
	8					2 ^a	bc	bc
Hiperativado Ca-Ion	1	10,8±6,8 ^c	3,6±3,1 ^b	5,5±4,2 ^b	32,6±16,	63,7±16,	0,2±0,3	0,7±1,4
	8				9 ^a	7 ^a	c	c

Hiperativado Ca-Ion : Calcio ionóforo, Proc.: Procaína, VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade linear progressiva; VAP: velocidade média da trajetória; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; ALH: Amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF: frequência de batimento cruzado. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

5.4. Avaliação da integridade de membrana espermática, reação acrossômica e ligação à zona pelúcida

Na tabela 7, foram apresentadas as taxas de espermatozoides com membrana íntegra e com acrossoma reagido avaliados por citometria de fluxo, e número de espermatozoides ligados à zona pelúcida (ZBA) após os protocolos de capacitação e hiperativação. Foi observada uma significativa redução do número de espermatozoides viáveis pós-capacitação e hiperativação em relação ao grupo controle pós-descongelamento. Em contrapartida, as taxas de reação acrossômica foram maiores no sêmen capacitado e hiperativado do que no sêmen pós-

descongelamento ($P < 0,05$). Os resultados mostram uma resposta positiva aos protocolos de capacitação e hiperativação espermática.

Os espermatozoides tratados com protocolo de hiperativação com o Cálcio Ionóforo mostraram um menor número de espermatozoides ligados a ZP em comparação aos hiperativados com a Procaina. Entretanto, não diferiram do meio não capacitante (Tab.7).

Tabela 7: Porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra (IP-) e com acrossoma reagido (RA+, PNA+/IP-) avaliados por citometria de fluxo, e número de espermatozoides ligados à zona pelúcida (ZBA) após os protocolos de capacitação e hiperativação (média±desvio padrão).

Tratamento	n	M íntegras (%)	RA+ (%)	Nº esp. ligados a ZP
Pós-descong./Não cap*	18	30,1±13,6 ^a	1,2±0,7 ^a	3,3±2,7 ^{ab*}
Cap. Controle	18	19,7±7,3 ^b	4,8±2,2 ^b	5,7±3,6 ^a
Hiperativado Proc	18	18,8±7,5 ^b	5,2±2,4 ^b	5,9±3,7 ^a
Hiperativado Ca-I	18	21,2±7,9 ^b	6,7±5,7 ^b	1,9±2,1 ^b

IP: iodeto de propídio, Proc=Procaina, Ca-Ion=Calcio-Ionoforo, Cap.=Capacitado, Pós-descong=pós-descongelamento. M=membranas, RA reação acrossômica, Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

No presente experimento, a adição de Lf não melhorou os parâmetros de motilidade espermática após o descongelamento do sêmen equino comparado ao grupo controle. Resultados similares foram observados quando a Lf foi adicionada a diluidores de resfriamento de sêmen equino a base de leite e caseinato com os espermatozoides avaliados após 24h de resfriamento (Martins et al, 2012). Os resultados do presente trabalho corroboram ainda com outros estudos que utilizaram diluidores a base de leite desnatado com adição de antioxidantes e observaram ausência de efeitos positivos sobre a motilidade espermática equina após o resfriamento do sêmen (Aurich et al, 1997). Por outro lado, em bovinos, foi observado um aumento da motilidade espermática pós-descongelamento quando os diluidores de congelamento de sêmen foram suplementados com diferentes concentrações de Lf. No entanto, tal melhora não foi refletida nas taxas de fertilidade *in vivo* (Kobayashi et al., 2007). Na maioria dos protocolos de resfriamento de sêmen equino geralmente não se procede à retirada do plasma seminal (PS), diferentemente do que ocorre na rotina do congelamento de sêmen. Desta forma, era esperado que a suplementação de antioxidantes no protocolo de congelamento fosse benéfica a motilidade, repondo os fatores de proteção aos ROS perdidos quando da retirada do plasma seminal. Contudo, tal resultado não foi verificado no presente trabalho. Foi evidenciado, entretanto, que a funcionalidade de membrana plasmática (MP) dos espermatozoides foi beneficiada pela adição da Lf. Embora não tenha diferido do diluidor com catalase, tal fato pode ser explicado pela redução verificada da concentração de ferro livre extracelular observado no grupo com Lf, a qual geraria uma consequente proteção das membranas espermáticas frente à peroxidação lipídica. Ball e Vo (2002) mostraram que a peroxidação lipídica é uma das consequências do processo de criopreservação e que sua ocorrência é aumentada pela presença de Fe^{++} no meio. O sequestro do Fe do ambiente externo pela Lf, portanto, pode impedir que ele desempenhe sua ação catalisadora na reação de Haber-Weiss, na qual se inicia a peroxidação lipídica através da transformação de O_2 e H_2O_2 no radical hidroxil (Baker e Baker, 2005). Desta maneira, menores concentrações de ferro estariam possivelmente ligadas a uma maior proteção das membranas espermáticas. No entanto, no presente experimento, não foi observada redução da produção das espécies reativas ao oxigênio NO e H_2O_2 em relação ao controle, corroborando com o achado por Martins et al (2012) ao testar a suplementação com lactoferrina em diluidores de resfriamento equino.

Na presente pesquisa, a adição de catalase ao diluidor de criopreservação de sêmen, não foi superior ao controle e nem ao INRA-Lf quanto à motilidade, integridade física, funcionalidade das membranas espermáticas, e redução das concentrações de NO e H_2O_2 pós-descongelamento. Resultados similares sobre a motilidade e integridade da membrana espermática foram encontrados no sêmen de garanhão resfriado a 5°C (Aurich et al., 1997, Ball et al., 2001). Por outro lado, já foram relatados resultados positivos da adição de catalase a diluidores de sêmen equino, reduzindo a geração de H_2O_2 pelos neutrófilos ativados, e prevenindo a redução da motilidade espermática total de garanhões (Baumber et al., 2002). Em bovinos, a incubação do sêmen descongelado em soluções com catalase e um agente oxidante (ferro e ascorbato), mostrou que a catalase eliminava o efeito do oxidante, aumentando a motilidade e o status da cromatina pós-incubação (Fernández Santos et al, 2008). Visto que no presente trabalho, não houve diferença entre as concentrações de NO e H_2O_2 no sêmen fresco e pós-descongelamento, é possível que não tenha havido aumento significativo da produção de radicais livres durante o processo de criopreservação,

evidenciando uma possível ação protetora do diluidor de sêmen INRA 82 sem adição de antioxidantes.

Para avaliação da capacidade fecundante dos espermatozoides criopreservados com diferentes antioxidantes foi realizada a indução da capacitação e hiperativação do espermatozoide equino com os agentes indutores procaína e cálcio ionóforo A23187. O protocolo de hiperativação induziu a redução da VSL, VAP e LIN observada com o CASA, a qual é compatível com a hiperativação espermática de acordo com Ortgies et al (2011). A entrada de cálcio intracelular através de canais de cálcio tem sido descrita como o principal requerimento para a ocorrência da hiperativação no espermatozoide (Sanchez-Gutierrez et al, 2006). Inúmeras drogas vêm sendo testadas como estimuladoras exógenas deste influxo, tais como a procaína (McPartlin et al, 2009) e o cálcio ionóforo (Landim-Alvarenga et al, 2001) no sêmen fresco. Portanto, é possível que, no presente estudo, a procaína e o cálcio ionóforo tenham induzido a hiperativação do espermatozoide criopreservado.

A amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) e a frequência de batimento cruzado (BCF) sofreram redução nos tratamentos com procaína e cálcio ionóforo, na presente pesquisa. Enquanto a BCF tende a diminuir durante a hiperativação (Ortgies et al, 2011), a amplitude de deslocamento lateral de cabeça tende a se elevar durante a indução da hiperativação (McPartlin et al, 2009; Ortgies et al, 2011). Entretanto, foi observado durante a avaliação que grande parte dos espermatozoides analisados apresentava as cabeças aglutinadas, em uma formação característica de capacitação (Figura 9). Como a avaliação computadorizada (CASA) analisa o movimento espermático através da trajetória da cabeça do espermatozoide (Ho e Suarez, 2001), tal situação pode ter levado a uma análise subestimada

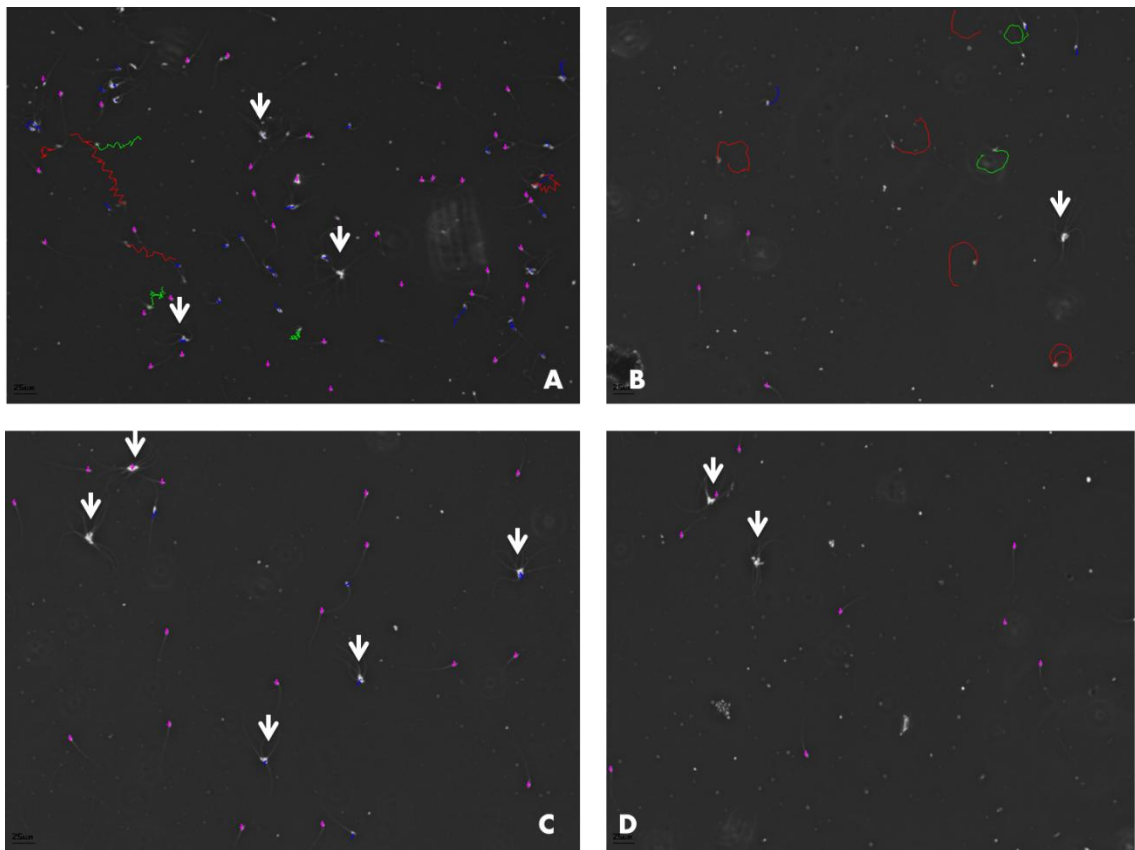


Figura 9: Planos de análise computadorizada (CASA). As setas indicam pontos de aglutinação das cabeças dos espermatozoides. A) Capacitado, B) Capacitado controle, C) Hiperativado Procaína, D) Hiperativado Cálcio ionóforo.

da ALH.

McPartlin et al (2009) mostraram que o tratamento do sêmen com procaína (5mM) resultou em mudanças nos parâmetros de motilidade, os quais definem a hiperativação em outras espécies (humanos, bovinos, suínos, macacos rhesus e roedores). Desta forma, definiram que a hiperativação do espermatozoide equino ocorre quando a $VSL \leq 46,5 \pm 4,4 \mu\text{m}/\text{seg}$, a $STR \leq 46,6\% \pm 2,9\%$ e a $LIN \leq 20,2\% \pm 0,7\%$, embora ainda não haja um padrão de hiperativação definido para a espécie equina. Ortgies et al (2011) consideraram que a procaína induziu a hiperativação ao reduzir a proporção de espermatozoides progressivamente móveis e suas respectivas VSL, LIN e BCF, e ao aumentar a ALH. Em contraste, Spizziri et al (2010) não detectou mudança nos padrões de motilidade a 0 ou 3 horas após o tratamento com procaína. Vale salientar que os valores relatados nesses trabalhos foram obtidos através do sêmen equino fresco, o que difere do presente trabalho, no qual foram avaliados espermatozoides congelados/descongelados, submetidos provavelmente a um maior número de injúrias durante o processamento.

Foi verificado menor taxa de reação acrossômica espontânea comparada aos grupos tratados para capacitação e hiperativação. Tal fato é ideal quando consideramos os diluidores de congelamento como meios de manutenção dos espermatozoides por longos períodos de tempo de forma a preservar sua capacidade fecundante. Foi demonstrado que a “maquinaria” espermática envolvida na capacitação e motilidade é vulnerável aos danos oxidativos durante o processo de fertilização *in vitro*, o que pode aumentar as falhas na fertilização (Tsunoda et al, 2012).

Os protocolos de capacitação e hiperativação reduziram a porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra, possivelmente devido ao aumento da permeabilidade das membranas espermáticas ao corante IP, decorrente do tratamento de capacitação espermática. Da mesma forma, foi possível observar uma resposta positiva à indução da RA no presente trabalho, nos grupos de espermatozoide capacitado e hiperativado. Apenas os estímulos gerados pelo meio capacitante (bicarbonato, proteínas, glicose, pH alcalino) já foram suficientes para deflagrar a reação acrossômica nos 3 grupos tratados. O efeito da procaína na indução da reação acrossômica em espermatozoides foi relatado em porquinhos da Índia (Sánchez- Gutiérrez et al, 2006). Os autores observaram alta taxa de RA e oócitos fertilizados após pré-tratamento dos oócitos em meio de cultura com glicose e procaína. No entanto, não foi encontrado um maior efeito dos indutores de hiperativação (procaína e cálcio ionóforo) no presente trabalho, sobre a indução da reação acrossômica no espermatozoide equino congelado comparado ao grupo capacitado. Este fato foi observado com espermatozoide equino *in natura* (McPartlin et al., 2009, Ortgies et al., 2011), corroborando com os resultados encontrados no presente experimento.

A capacidade de ligação do espermatozoide equino à zona pelúcida de oócito bovino foi similar nos 3 diluidores de congelamento (Fig.10). Entretanto, quando avaliados apenas os protocolos de hiperativação, o espermatozoide equino capacitado e hiperativado com cálcio ionóforo mostrou-se inferior ao espermatozoide tratado com a Procaína quanto à capacidade fecundante. Foi relatado que a utilização do meio de Whitten capacitante associado à hiperativação com procaína em espermatozoide equino proveniente de sêmen fresco foi eficiente na fertilização *in vitro* de oócitos de égua (60,7%; McPartlin et al, 2009). Entretanto,

mais trabalhos são necessários para o esclarecimento dos mecanismos de ação da procaína, e sua associação à Lf visando um aumento da fertilidade do semen equino *in vivo* e *in vitro*.

Conclui-se que a Lf promoveu maior proteção à funcionalidade da membrana do espermatozoide equino criopreservado, e que a hiperativação com o calcio ionóforo reduziu a ligação de espermatozoides equinos congelados/descongelados ao oócito bovino, em comparação à procaína e ao meio capacitante.

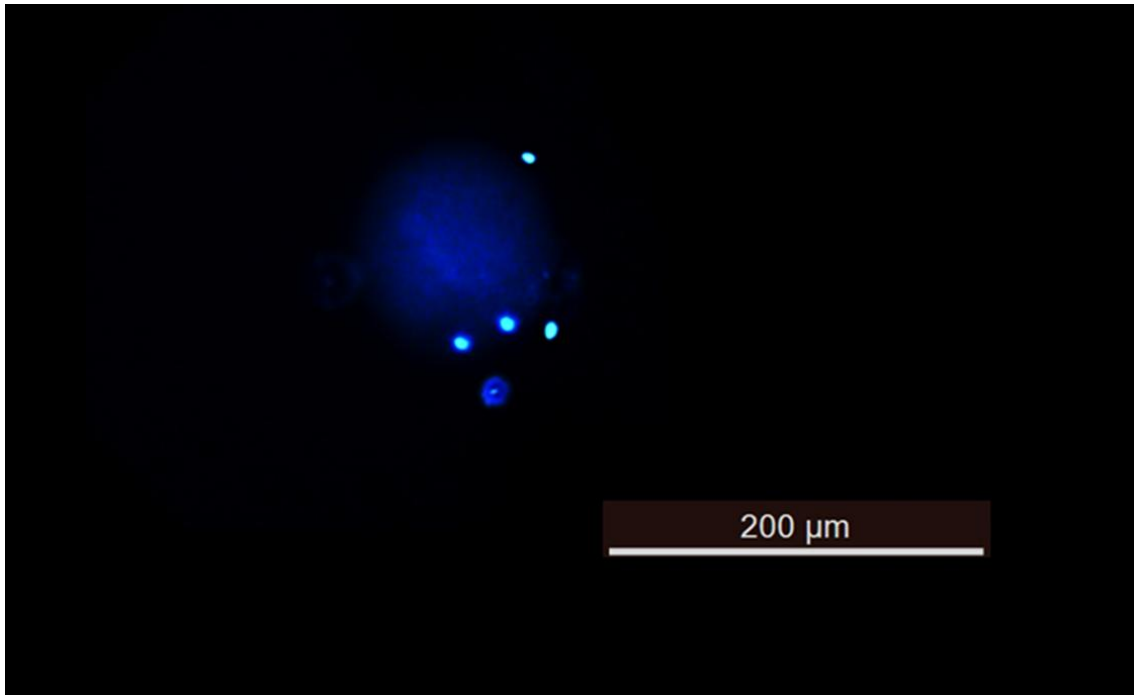


Figura 10: Fotomicrografia mostrando os espermatozoides equinos ligados a zona pelúcida bovina (coloração Hoechst 33342).

7. CONCLUSÕES

- O antioxidante Lactoferrina melhorou a qualidade do sêmen equino criopreservado através da redução da concentração de ferro livre, e do aumento do percentual de espermatozoides com membrana funcional pós-descongelamento.
- O cálcio ionóforo reduziu a ligação do espermatozoide congelado/descongelado à zona pelúcida de bovino em comparação à procaína e ao meio capacitante.
- O meio Whitten's não capacitante promoveu uma taxa ligação do espermatozoide equino congelado a ZP bovina semelhante ao meio capacitante e com adição de procaína, não sendo portanto, necessária a adição dos mesmos para a ZBA heteróloga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFZELIUS, B.A., DALLAI, R., LANZAVECCHIA, S. et al. Flagellar structure in normal human spermatozoa and in spermatozoa that lack dynein arms. *Tissue Cell*, v. 27, p. 241–247, 1995.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.659-668, 1995.
- AITKEN, R.J. The Amoroso lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis. *J. Reprod. Fertil.*, v.115, p.1–7, 1999.
- AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.W.; WEST, K. et al. On the use of paramagnetic beads and ferrofluids to assess and eliminate the leukocytic contribution to oxygen radical generation by human sperm suspensions. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v. 35, p.541–551, 1996.
- AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalyzed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil.*, v.98, p.257–265, 1993.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS et al. Organização interna da célula: Estrutura da membrana. In: *Biologia Molecular da Célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 10, p. 583-595.
- ALM, H.; TORNER, H.; BLOTTNER, S. et al. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. *Theriogen.*, v.56, p.817–829, 2001.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence of increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl*, v. 13, p.232-241, 1992.
- ALVAREZ, J.G.; TOUCHSTONE, J.C.; BLASCO, L. et al. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl.*, v. 8, p.338–348, 1987.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. Cap. 80, p. 717-718.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Prac.*, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H. et al. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled stored stallion semen. *Theriogenology*, v. 48, p.185–192, 1997.
- BAKER, E.N.; BAKER, H.M. Molecular structure, binding properties and dynamics of Lactoferrin. *Cell Mol. Life Sci.*, v.62, p. 2531–2539, 2005.

- BALABAN, R.S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, v. 120, p. 483–495, 2005.
- BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim. Reprod. Sci.*, v.107, p. 257-267, 2008.
- BALL, B.A.; VO, A. Detection of Lipid Peroxidation in Equine Spermatozoa Based Upon the Lipophilic Fluorescent Dye C11-BODIPY581/591. *J. Androl*, v.23, n. 2, p. 259-269, 2002.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic Tolerance of Equine Spermatozoa and the Effects of Soluble Cryoprotectants on Equine Sperm Motility, Viability, and Mitochondrial Membrane Potential. *J. Androl*, v.22, n.6, p. 1061-1069,2001.
- BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Cand J Comp Med Vet Sci.*, v. 21, p. 47-51, 1957.
- BATTELIER, F., MAGISTRINI, M., FAUQUANT, J., PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.48, p.391-410. 1997.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. et al. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl*, v.21, p.895–902, 2000.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Am J Vet Res*, v.66, p.772–779, 2005.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. et al. Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. *J Androl.*, v. 24, n. 4, p.621-628, 2003b.
- BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A. et al. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.60, p.1239–1247, 2003a.
- BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K. et al. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 57, p.1005–1198, 2002.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Develop*, v. 73, n. 10, p. 1338-1344, 2006.
- BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; BATTUT, I. et al. In vitro fertilization in the mare. *R Med. Vet. L'Ecole D'Alfort*, v.168, p. 993-1003, 1992.
- BIELANSKI, W. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. *J. Reprod. Fert.*, Suppl 23, p.19-24, 1975.

- BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. *Theriogenology*, v.54, p.129–136, 2000.
- BURGOS, M.H., FAWCETT, D.W. Studies on the fine structure of mammalian testis I: Differentiation of spermatids in the cat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* v.1, p. 287–300, 1955.
- BURNAUGH, L.M.; BALL, B.A.; SABEUR, K. et al. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.117 (3-4), p. 249-260, 2010.
- CARLSON, A.E.; HILLE, B.; BABCOCK, D.F. External Ca²⁺ acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev Biol*, v.312, p.183–192, 2007.
- CARLSON, A.E.; WESTENBROEK, R.E.; QUILL, T. et al. CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci*, v.100, p.14864–14868, 2003.
- CHATEERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing freezing and thawing. *Mol Reprod Dev.*, v.59, p. 451-458, 2001.
- CHEN, Y.; CANN, M.J.; LITVIN, T.N. et al. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*, v. 289, p. 625–628, 2000.
- CHEN, Y.; FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiol*, v. 30, p.421-431, 1993.
- CHENG, F-P.; FAZELI, A.; VOORHOUT, W.F. et al. Use of PNA (Peanut Agglutinin) to assess the acrosomal status and the zona pellucida induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J. Andr.*, v. 17, p.674-682, 1996.
- CHRISTENSEN, P.; PARLEVLIET, J.M.; VAN BUITEN, A. et al. Ultrastructure of fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Biol. Reprod.*, Mono 1, p.769-777, 1995.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- COLENBRANDER, B.; FAZELI, A.R.; VAN BUITEN, A. et al. Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse. *Acta vet. Scand.*, Suppl 88, p.49-58, 1992.
- COMHAIRE, F.H.; HUYSSSE, S.; HINTING, A. et al. Objective semen analysis: has the target been reached? *Human Reprod.*, v. 7, p.237-241, 1992.
- COUTINHO DA SILVA, M.A.; SEIDEL, G.E.; SQUIRES, E.L. et al. Effects of components of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine or equine zonae pellucidae. *Reproduction*, v. 143, p. 577–585, 2012.

CROSS, N.L. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biol. Reprod.*, v.54, p.138–145, 1996.

DADOUNE, J.P., SIFFROI, J.P., ALFONSI, M.F. Transcription in haploid male germ cells. *Int. Rev. Cytol.* v.237, p. 1–56, 2004.

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

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. reprod.*, v. 2, p.48-54, 1997.

DELL'AQUILA, M.E.; CHO, Y.S.; MINOIA, P. et al. Effects of follicular fluid supplementation of in-vitromaturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.*, v. 12, p.2766–72, 1997b.

DELL'AQUILA, M.E.; CHO, Y.S.; MINOIA, P. et al. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and in vitro-matured equine oocytes. *Theriogen.*, v. 47, p.1139–56, 1997a.

DELL'AQUILA, M.E.; FUSCO, S.; LACALANDRA, G.M. et al. In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogen.*, v.45, p.547–60, 1996.

DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G.A. Field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology*, v. 22, p. 291 - 303, 1984.

DOWSETT, K.F.; PATTIE, W.A. Characteristics and fertility of stallion semen. *J. Reprod. Fert.*, Suppl 32, p.1-8, 1982.

DREVIUS, L.O.; ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp. Cell Res.*, v. 42, p.136-156, 1966.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Ver*, v. 82, p. 47–95, 2002.

FAWCETT, D.W. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol. Reprod.* v.2, p. 90–127, 1970.

FAZELI, A.R.; STEENWEG, W.; BEVERS, M.M. et al. Relation between stallion sperm binding to homologous hemizonae and fertility. *Theriogenology*, v. 44, p. 751–760, 1995.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; ESTESO, M.C. et al. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. *Int J Androl*, v.32, p.353–359, 2008.

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

GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B. Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview. In: *Proceedings of a work shop on transporting gametes and embryos*, 12, 2003, Brewster – Massachusetts, p. 43-48.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M. et al. Capacitation and acrosome reaction in equine sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 68, n.3-4, p. 249-265, 2001.

GOMEZ, E.; BUCKINGHAM, D.W.; BRINDLE, J. et al. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl.*, v. 17, p. 276–287, 1996.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, J.M.; MORELLA, F.J.; PEÑA, B. et al. Osmotic shock induces structural damage on equine spermatozoa plasmalemma and mitochondria. *Theriogenology*, v. 78, p.415–422, 2012.

GOODSON, S. G.; QIU, Y.; SUTTON, K. A. et al. Metabolic substrates exhibit differential effects on functional parameters of mouse sperm capacitation. *Biol. Reprod.*, v.87, p. 75, 2012.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v. 12, p. 131-147, 1996.

GRAHAM, J.K. Response of sperm to freezing and analysis of sperm. *Proc. Ann. Meet. Soc. Theriog.*, p.170-177, 1997.

GREEN, D.P.L. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Reprod*, v. 2, p. 147–156, 1997.

HAFEZ, E. S. E. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: *Reprodução Animal*. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. Cap. 24, p. 513- 535.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 2 ed. Oxford: Clarendon Press, 1999.

HINRICHS, K.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P. et al. In vitro fertilization of in vitro-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization in vivo after oviductal transfer. *Biol Reprod*, v. 67, p.256–262, 2002.

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

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 62, p.3–22, 2000.

HUYSER, C.; FOURIE, F. LE-R.; MOOLMAN, H. The influence of sera, follicular fluids and seminal plasma on human sperm–zona pellucida binding. *Hum. Reprod.*, v.12, p.792–799, 1997.

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

INAGAKI, M.; KIKUCHI, M.; ORINO, K. et al. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.64, n.1, p.75-77, 2002.

IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril.*, v.57, p.409–416, 1992.

JASKO, D.J. Evaluation of stallion semen. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.*, v.8, p.129-148, 1992.

JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER, W.D.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 37, p.1241–1252, 1992.

JASKO, D.J.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *J. Am.Vet. Med. Assoc.*, v.197, p.389-394, 1990.

JASKO, J. D. Procedures for cooling and freezing equine semen. *Ars. Vet.*, v.10, n.2, p.156-165, 1994.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*, v. 70, p. 219-228, 1984.

KANWAR, K.C.; YANAGAMASHI, R.; LOPATA, A. Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, v. 31, p. 321-327, 1979.

KATILA, T. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta vet. scand.*, v. 42, p.199-217, 2001.

KENNEY, R.M., BERGMAN, R.V., COOPER, W.L. et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: *Proc. 21st Am. Ass. Eq. Pract.*, p.327-349. 1975.

KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R. et al. Manual for clinical fertility evaluation of the stallion. Hastings: Journal Society *Theriogenology*, v.9, 100p, 1983.

KIKUCHI, M.; TAKAO, Y.; TOKUDA, N. et al. Relationship between seminal plasma lactoferrin and gonadal function in horses. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.65, n.11, p.1273-1274, 2003.

KNEISSL, S. Tiefgefrierkonservierung von Pferdesperma: Einfluss der Samenentnahmetechnik, Zentrifugation, Konfektionierungsform und Einfriermethode auf die Motilität und Membranintegrität der Samenzellen. (Cryopreservation of stallion semen: The influence of semen collection techniques, centrifugation, packaging forms, and methods of freezing on the motility and plasma membrane integrity of spermatozoa). Tese de doutorado. Hannover, 1993.

KOBAYASHI, J.; SUDA, Y.; TAKADA, N. et al. Motility and fertility of bull spermatozoa frozen in egg yolk extender supplemented with lactoferrin. *Reprod Fertil Develop*, v.19, n.1, p.125-126, 2007.

LAGARES, M. A. Bestimmung der osmotischen Resistenz von Hengstsamenzellen (The determination of the osmotic resistance of stallion spermatozoa). Tese de doutorado. Hannover, 1995.

LAGARES, M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H. et al. Assessing equine sperm-membrane integrity. *Andrology*, v. 32, n.3, p. 163-167, 2000.

LAMBERT, I.H. Reactive oxygen species regulate swelling-induced taurine efflux in NIH3T3 mouse fibroblasts. *J.Membr. Biol.*, v. 192, p.19–32, 2003.

LAMBERT, I.H.; PEDERSEN, S.F.; POULSEN, K.A. Activation of PLA2 isoforms by cell swelling and ischaemia/hypoxia. *Acta Physiol*, v. 187, p. 75–85, 2006.

LANDIM-ALVARENGA, F.; ALVARENGA, M.A.; SEIDEI, G.E. et al. Penetration of zona-free hamster, bovine e equine oocytes by stallion and Bull spermatozoa pretreated with equine follicular fluid, dilauroylphosphatidylcholine or calcium ionophore A231887. *Theriogenology*, v.56, p.937-953, 2001.

LECLERC, P.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Rad Biol Med.*, v. 22, p.643–656, 1997.

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

LOMEO, A. M.; GIAMBERSO, A. M. “Water test”: a simple method to assess sperm-membrane integrity. *Int J Androl*, v. 14, n.4, p. 278-282, 1991.

LOOMIS, P.R.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L. et al. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA lactose- egg yolk and packaged in straws. *J Anita Sci*, v. 56, p.687-693, 1983.

LOUX, S.C.; CRAWFORD, K.R.; ING, N.H. et al. CatSper and the Relationship of Hyperactivated Motility to Intracellular Calcium and pH Kinetics in Equine Sperm. *Biol Reprod*. v.89, n.5, p.1-15, 2013.

MAGISTRINI, M. Semen evaluation. IN: SAMPER, J. C. *Equine breeding management and artificial insemination*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. Cap.8, p. 91-108.

- MAGISTRINI, M.; GUITTON, E.; LEVERN, Y. et al. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology*, v. 48, n.7, p. 1229-1235, 1997.
- MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology*, v. 48, p. 523-530, 1997.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J.Reprod. Immunol.*, v.53, p. 109-119, 2002.
- MARTINS, H.S.; LAGARES, M.A.; SOUZA, M.R. et al. Effects of lactoferrin supplementation to milk -and caseinate- based extenders on sperm motility, membrane integrity and nitric oxide levels of cooled stallion semen (Abstract). *J Eq Vet Sci.*, v.32, p.495, 2012.
- MC PARTLIN, L.A.; SUAREZ, S.S.; CZAYA, C.A. et al. Hyperactivation of Stallion Sperm Is Required for Successful In Vitro Fertilization of Equine Oocytes. *Biol. Reprod.*, v.81, p.199–206, 2009.
- MCKINNON, A. O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. *Australian Equi Vet*, v. 14, n. 4, p. 156-174, 1996.
- MEYERS, S.A. Cryostorage and oxidative stress in mammalian spermatozoa. *Proceedings Association for Applied Animal Andrology Conference- Vancouver*, 2012, p. 85-100.
- MEYERS, S.A. Sperm Physiology. In: SAMPER, J.C. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. 2.ed. St. Louis: Saunders, 2009. Cap 5, p. 45-57.
- MIES FILHO, A. Tecnologia do semen I – Exame e classificação. In: *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. 3. ed. Porto Alegre: Sulina, 1975. v. 2. p. 423-458.
- MILLER, C.D. Optimizing the use of frozen–thawed equine semen. *Theriogenology*, v.70, p.463–468, 2008.
- MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasmamembrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, v.51, p.241–249, 2005.
- MORRIS, G.J.; FASZER, K.; GREEN, J.E. et al. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology*, v. 68, p. 804–812, 2007.
- MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update*, v.3, p.403–439, 1997.
- MORTIMER, S.T.; SWAN, M.S.; MORTIMER, D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, v.13, n.8, p.2139–2146, 1998.

NASCIMENTO, J. Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (microscopia e epifluorescência) de espermatozóides equinos criopreservados. 2006. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo.

NASH, T. Chemical constitution physical properties of compounds able to protect living cells again damage due to freezing and thawing. In: MERYMAN, H. T. *Cryobiology*. London, New York: Academic press, 1966, p. 179-220.

NEILD, D.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; COLENBRANDER, B. et al. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 72, p.230–238, 2005.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem*, v.220, p. 403-409, 1994.

OKABE, M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development*, v. 140, p.4471-4479, 2013.

OLSON, G.E., LINCK, R.W. Observations of the structural components of flagellar axonemes and central pair microtubules from rat sperm. *J. Ultrastruct. Res.* v.61, p.21–43, 1977.

OLSON, S.D.; FAUCI, L.J.; SUAREZ, S.S. Mathematical modeling of calcium signaling during sperm hyperactivation. *Mol Hum Reprod*, v. 17, p. 500–510, 2011.

ORTGIES, F.; KLEWITZ, J.; GORGENS, A. et al. Effect of procaine, pentoxifylline and trolox on capacitation and hyperactivation of stallion spermatozoa. *Androl.*, v.44, p. 130–138, 2011.

PALMER, E.; BEZARD, J.; MAGISTRINI, M. et al. In vitro fertilization in the horse: a retrospective study. *J.Reprod.Fertil.Suppl*, v.44, p. 375-384, 1991.

PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Automated analysis of stallion semen post-thaw motility. *Acta vet. Scand. Suppl* 88, p.137-152, 1992.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, n.2, p.209-222, 1992.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation: Review. *Micron*, v. 37, p. 597–612, 2006.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. Cap. 83, p. 769-789.

POMMER, A.C.; RUTLLANT, J.;MEYERS, S.A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology*, v. 58, p.1373–1384, 2002.

RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. et al. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod*, v. 65, n. 2, p. 462 – 470, 2001.

REN, D.; NAVARRO, B.; PEREZ, G. et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, v. 413, p.603–609, 2001.

RICKER, J.V.; LINFOR, J.J.; DELFINO, W.J. et al. Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants. *Biol. Reprod.*, v. 74, p. 359-365, 2006.

ROCA, J.; MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; GIL, M.A. et al. Dead spermatozoa in raw semen samples impair in vitro fertilization outcomes of frozen-thawed spermatozoa. *Fertil. Steril.*, v. 100, n. 3, p. 875-881, 2013

ROVAN, E. Biochemistry of spermatozoa. In: BUSCH, W., HOLZMANN, A. *Veterinary Medicine Andrology, Physiology and Pathology of Reproduction in Male Animals*. Stuttgart: Schattauer, 2001, p. 23–54.

SABEUR, K.; BALL, B.A. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. *Reproduction*, v. 134, p.263–270, 2007.

SABEUR, K.; BALL, B.A. Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, v. 67, p.701–706, 2006.

SAMPAIO, I. B. M. Testes estatísticos para comparação de médias. In: *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. Cap. 17. p. 189-207.

SAN AGUSTIN, J. T.; WITMAN, G. B. Role of cAMP in the reactivation of ram sperm. *Cell Motil. Cytoskel.* v.27, p.206-218, 1994.

SANCHEZ-GUTIERREZ, M.; DELGADO-BUENROSTRO, N.L.; ZARATE-GRANDE, M. et al. In guinea pig spermatozoa, the procaine-promoted synchronous acrosome reaction results in highly fertile cells exhibiting normal F-actin distribution. *Reproduc. Toxicol.*, v.21, p.208–215, 2006.

SANCHEZ-PARTIDA, L.G.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M.C. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, v. 9, p.689-696, 1997.

SENGER, P. L. Spermatozoa in the female tract: transport, capacitation & fertilization. In: *Pathways to pregnancy and parturition*. 2 ed. Moscow: Current Conceptions, Inc, 2003. Cap. 12, p. 266-283.

SIKKA, S.C. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. *J. Androl*, v. 25, n.1, p.5-18, 2004.

SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, v.175, n.4023, p. 720-731, 1972.

- SMITH, A.U.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperature. *Nature*, v.166, p. 668–669, 1950.
- SPIZZIRI, B.E.; KAULA, N.; SQUIRES, E.L. et al. In vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Ani Reprod Sci*, v. 121, p.181–183, 2010.
- SUAREZ, S.S. Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update*, v. 14, p.647–657, 2008.
- THALER, C.J.; VANDERPUYE, A.; MCINTYRE, J.A. et al. Lactoferrin Binding Molecules in Human Seminal Plasma. *Biol. Reprod.*, v. 43, p.712-717, 1990.
- THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A., BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, v. 65, p.1531–1550, 2006.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim. Reprod.Scien.*, v.89, p. 159-170, 2005.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A.M.; EKHLASI-HUNDRIESER, M. Oocyte–sperm interactions. *Anim Reprod Sci*, v.60-61, p.653-662, 2000.
- TSUNODA, S.; KAWANO, N.; MIYADO, K. et al. Impaired Fertilizing Ability of Superoxide Dismutase 1-Deficient Mouse Sperm During In Vitro Fertilization. *Biol Reprod*, v. 87, n.5, art 121, p.1-6, 2012.
- VARNER, D.D.; VAUGHAN, S.D.; JOHNSON, L. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. *Am. J.Vet.Res.*, v. 52, p. 224-230, 1991.
- VERNET, P.; AITKEN, R.J.; DREVET, J.R. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrin*, v. 216, p. 31–39, 2004.
- VERNET, P.; FULTON, N.; WALLACE, C. et al. Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v.65, p.1102–1113, 2001.
- VIDAMENT, M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci*, v. 89, p.115–136, 2005.
- VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M. et al. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethylformamide. *Theriogenology*, v.58, p. 249–251, 2002.
- VIDAMENT, M.; DUPERE, M.; JULIENNE, P. et al. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology.*, v.48, n. 6, p.907-917, 1997.
- VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P. et al. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.54, p.907–919, 2000.
- VISCONTI, P. E.; GALANTINO-HOMMER, H.; NING, X. P. et al. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. *J. Biol. Chem.*, v. 274, n. 5, p. 3235-3242, 1999.

VOSS, J.L.; PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.178, p.287-289, 1981.

WALDEYER, W. Bau und Entwicklung der Samenfäden. *Anat. Anz.*, v. 2, p. 345–368, 1887.

WANG, P.; LIU, B.; WANG, Z. et al. Characterization of lactoferrin receptor on human spermatozoa. *Reprod. biomed.*, v.319, n. 22, p.155-161, 2011.

WARNER, F.D. Crossbridge mechanisms in ciliary motility. In: BOOK, C., GOLDMAN, R.D., POLLARD, T.D., ROSENBAUM, J.L. *Cell Motility*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1976. p. 891–914.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Develop*, v.7, n.4, p.871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60-61, p. 481–492, 2000.

WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. In: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Vol. 1. Ed CA Finn. Oxford, Clarendon Press, 1979, p 283-350.

WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effects of phosphatidilserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrossomal integrity of stallion sperm prior to and after cryopreservation. *Cryobiology*, v. 33, n.3, p. 320-329, 1996.

YANAGIMACHI, R.; LOPATA, A.; ODOM, C.B. Retention of biological characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt-stores eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. *Fertil Steril*, v.31, n.5, p.562-574, 1979.

ZAFIAN, P. T. *Plasma membrane alterations induced in bovine spermatozoa by cryopreservation*. M. S. 1984. Tese (Doutorado em Reproductive Endocrinology). Colorado State University, Colorado.

ZEGINIADOU, T.; PAPADIMAS, J.; MANTALENAKIS, S. Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. *Andrologia*, v. 32, n.9, p. 335-343, 2000.

ANEXOS

Anexo 1

MEIOS DILUIDORES

Meio de Kenney (Kenney *et al.*, 1975)

Componentes	Quantidade (100 mL)
Glicose	4,9g
Leite em Pó (desnatado)	2,4g
Sulfato de Gentamicina	100mg
Bicarbonato de sódio 8,4%	1,6mL
pH	6,8
Osmolaridade	392 mOsm

Meio INRA 82 para congelamento de semen equino (Vidament *et al.*, 1997)

Componentes	Quantidade (100mL)
Leite desnatado em pó	5g
Glicose	2,5g
Lactose	0,15g
Rafinose	0,15g
Citrato de Sódio	0,025
Citrato de Potássio	0,041g
Hepes	0,476g
Gema de ovo	2 ml (2%)
Glicerol	2,5 ml (2,5 %)
Sulfato de gentamicina	5 mg
Penicilina G	5.000 UI
pH	6,64

Anexo 2

FICHA DO EXPERIMENTO

PROTOCOLO PARA SÊMEN EQUINO CONGELADO

Garanhão: _____ Data: ___/___/___ Hora: _____ N° do
 Ejac.: _____
 Idade: _____

Exame do sêmen fresco

Volume: _____ mL Aspecto: leitoso aquoso soroso cremoso

Motilidade Total: _____ Motilidade Progressiva: _____

Vigor: _____

Concentração: _____ sptz/mL N° total

sptz: _____ sptz/ejaculado

Centrifugação: Diluído 1:1 Kenney 400g/10min Deixar 10% do plasma seminal

Espaço para cálculo:

Exame do sêmen diluído

	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
<input type="checkbox"/> INRA 82			
<input type="checkbox"/> INRA 82+ lactoferrina 500µg/mL			
<input type="checkbox"/> INRA82+ catalase 200UI/mL			

Resfriamento: _____ min até 5°C 20 min no vapor de N₂ N₂

líquido

Caneco: _____

Teste hiposmótico: Íntegros: _____ Lesados: _____

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Garanhão: _____ Data: ___/___/___

Avaliação morfológica (%): (Técnica: preparação úmida)	
Total de espermatozoides normais:	
Defeito de Acrossoma	
Defeito de Cabeça (cab. destacada, subdesenvolvido)	
Defeito de Peça intermediária, quebrada, espessada)	
Gota Citoplasmática Proximal	
Gota Citoplasmática Distal	
Defeito de cauda (dobrada)	
Defeito de inserção (inserção retro e para-axial)	
Formas teratológicas:	
Total de defeitos:	

Anexo 3

**AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE ESPERMATOZÓIDES COM REAÇÃO
ACROSSÔMICA ESPONTÂNEA E MEMBRANA ÍNTEGRA COM OS CORANTES
(PNA/IP)
COM CITOMETRIA DE FLUXO**

- a) Solução estoque PNA-FITC: 1500µg/mL
 - b) Solução trabalho: 100µL da solução estoque + 2 mL de PBS (75µg/mL)
 - c) Solução trabalho IP: 0,5mg de IP + 1mL de solução salina (0,9% NaCl)
- Diluir a amostra de sêmen na proporção 1:20 em PBS a 37°C.
 - Misturar 200µL da suspensão acima + 15µL da solução trabalho de FITC-PNA (Concentração final 1,125µg/mL)
 - Incubar 10 min a 37°C em banho maria
 - Adicionar 1mL PBS + 15µL IP (solução trabalho 1,5mM) e incubar por mais 10 min em temperatura ambiente
 - Fazer a leitura no citômetro de fluxo.

**AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE ESPERMATOZÓIDES COM REAÇÃO
ACROSSÔMICA INDUZIDA COM PROCAÍNA E CÁLCIO IONÓFORO E
MEMBRANA ÍNTEGRA COM OS CORANTES (PNA/IP) COM CITOMETRIA DE
FLUXO**

- a) Solução estoque PNA-FITC: 1500µg/mL
 - b) Solução trabalho: 100µL da solução estoque + 2 mL de PBS (75µg/mL)
 - c) Solução trabalho IP: 0,5mg de IP + 1mL de solução salina (0,9% NaCl)
- Diluir a amostra de sêmen na proporção 1:2 em meio Whittens a 37°C.
 - Misturar 200µL da suspensão acima + 15µL da solução trabalho de FITC-PNA (Concentração final: 1,125µg/mL)
 - Incubar 10 min a 37°C em banho maria
 - Adicionar 1mL PBS + 15µL IP (0,75mM) e incubar por mais 10 min em temperatura ambiente
 - Fazer a leitura no citômetro de fluxo.

Anexo 4**PROTOCOLO DE INDUÇÃO DA CAPACITAÇÃO E HIPERATIVAÇÃO *IN VITRO* DO ESPERMATOZÓIDE EQUINO CONGELADO/DESCONGELADO**

1. Descongelar 1 palheta de sêmen a 37°C por 30 seg.
2. Colocar 1 mL de meio Whittens capacitante em 2 tubos de 4mL.
3. Fazer o *Swim-up*: Adicionar 250µL de sêmen no fundo de cada tubo e incubar por 20 min em incubadora a 38,2°C com 5% CO₂.
4. Retirar 750µL do sobrenadante e colocar em tubo cônico e centrifugar a 500g por 7 min.
5. Descartar o sobrenadante deixando de 25-30µL de sedimento.
6. Ressuspender com o mesmo volume (25-30µL) de meio Whittens capacitante suplementado com os indutores Procaína e Cálcio ionóforo A23187.
 - a) Procaína: Adicionar 0.0136g de cloridrato de procaína (Sigma P-9879) em 10mL de meio Whittens capacitante (concentração final 5mM)
 - b) Cálcio ionóforo: Adicionar 5,26µL da solução estoque (1mg de Cálcio Ionóforo A23187+ 2mL de DMSO= 0,00095M) a 994,64µL de meio Whittens capacitante.
 - c) Controle: meio Whittens capacitante.
7. Incubar por 10 min a 37°C.
8. Calcular a concentração esp/mL. Diluir com meio Whittens capacitante até uma concentração final de 10x10⁶/mL de forma a reduzir a concentração de indutores de capacitação e se obter a concentração de espermatozóides necessários para a FIV.

OBS: Para o tratamento “Não capacitante” foi seguido o mesmo protocolo com a substituição do meio Whittens capacitante pelo meio Whittens não capacitante.

Anexo 5**PROTOCOLO PARA O ENSAIO DE LIGAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDE EQUINO À ZONA PELÚCIDA DE OÓCITO BOVINO (ZBA, *zona binding assay*)**

- Lavar os oócitos 4x em meio de Hanks+10%SFB
- Incubar os oócitos em meio de Hanks+10%SFB por 1 hora a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂.
- Distribuir os oócitos aleatoriamente em gotas de 45µL de meio 199 com sais de Earle +10%SFB (5 oócitos/grupo) e adicionar 5µL da suspensão de espermatozóides.
- A suspensão de espermatozóides será feita conforme o tratamento de capacitação e hiperativação, com a diferença que o meio Whittens utilizado deve ser suplementado com 35µg/mL de Hoechst 33342, e com ressuspensão até a concentração final de 2x10⁶ spz/mL.
- Incubar os oócitos e espermatozóides por 2 horas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂.
- Lavar os oócitos vigorosamente em 4 gotas de Meio 199 com sais de Earle+10%SFB usando uma pipeta de Pasteur de ponta fina.
- Montar a lâmina com os oócitos utilizando suporte de vaselina para a lamínula.

Anexo 6

MEIOS PARA PROTOCOLO DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA *IN VITRO*

Meio de Whitten não-capacitante modificado (pH=7,25)

Composição	mM	PM	g/500mL	g/50mL	g/100mL
NaCl	100	58.44	2.922	0.2922	0.5844
KCl	4.7	74.55	0.175	0.0175	0.035
MgCl ₂	1.2	95.21	0.057	0.0057	0.114
Glicose	5.5	180.2	0.496	0.0496	0.992
Hepes (H3375)	22	238.3	2.621	0.2621	0.5242
Piruvato de sódio	1	88.06	0.04403	0.004403	0.008806
Ácido lático sal hemicálcio	2.4	218.22	0.262	0.0262	0.0524
Gentamicina 50µL/mL				50µL	100 µL
Phenol red				250µL	500µL

Meio Whittens modificado capacitante (pH=8.5)

Composição	mM	PM	g/500mL	g/50mL	g/100mL
NaCl	100	58.44	2.922	0.2922	0.5844
KCl	4.7	74.55	0.175	0.0175	0.035
MgCl ₂	1.2	95.21	0.057	0.0057	0.114
Glicose	5.5	180.2	0.496	0.0496	0.992
Hepes (H3375)	22	238.3	2.621	0.2621	0.5242
Piruvato de sódio	1	88.06	0.04403	0.004403	0.008806
Ácido lático sal hemicálcio	2.4	218.22	0.262	0.0262	0.0524
Gentamicina 50µL/mL				50µL	100 µL
Phenol red				250µL	500µL
BSA	7mg/mL			0.35	
NaHCO₃	25	84.01		0.105	

Distribuir o meio de Whitten não-capacitante em 2 amostras de 50mL. A cada uma delas adicionar BSA e bicarbonato de sódio. Fazer o meio na capela de fluxo laminar com lamparina acesa. Corrigir o pH com NaOH 10%. Filtrar o meio, identificar e colocar para equilibrar na incubadora com 5% CO₂ por pelo menos 3 horas.