

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**“Avaliação das características do espermatozóide equino congelado submetido a
inclusão e remoção do colesterol das membranas”**

CAMILA HADDAD DE OLIVEIRA

Belo Horizonte – MG
EV-UFGM
2007

CAMILA HADDAD DE OLIVEIRA

“Avaliação das características do espermatozóide eqüino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas”

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária.

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

**Belo Horizonte – MG
EV-UFMG
2007**

O48e Oliveira, Camila Haddad de, 1981-

Avaliação das características do espermatozóide de equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas / Camila Haddad de Oliveira. – 2007.

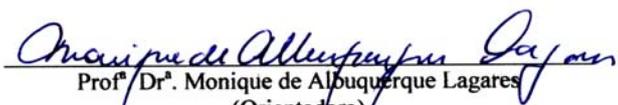
84p. : il.

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

1. Equino – Reprodução – Teses. 2. Sêmen congelado – Análise – Teses. 3. Equino – Espermatozóides – Teses. 4. Colesterol – Teses. I. Lagares, Monique de Albuquerque. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 926

Dissertação defendida em 02 de julho de 2007 e aprovada pela banca examinadora constituída por:


Prof.^a / Dr.^a. Monique de Albuquerque Lagares
(Orientadora)


Prof. Dr. Guilherme Ribeiro do Vale


Prof. Dr. Marc Roger Jean Marie Henry


Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

Meus pais são como cristais,
puros e sem quaisquer sinais,
simples como vidros, mas antes,
valiosos como raros diamantes.

Não viveria sem seus amores,
pois a vida seria apenas dores,
por isto quando chega o poente,
agradeço a Deus este presente

Sempre foram o meu alento,
minha alegria e sentimento,
amor assim tão verdadeiro,
sobrevive um infinito inteiro.

(Mundim, 2003)

Dedico.

Concedei-me, Senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar aquelas que posso e sabedoria para conhecer a diferença entre elas. Vivendo um dia de cada vez; desfrutando um momento de cada vez; aceitando que as dificuldades constituem o caminho à paz; aceitando, como Ele aceitou, este mundo tal como é, e não como Ele queria que fosse; confiando que Ele acertará tudo contanto que eu me entregue à Sua vontade; para que eu seja razoavelmente feliz nesta vida e supremamente feliz com Ele eternamente na próxima.

Oração da Serenidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por ter me dado forças para continuar em cada amanhecer e estar aqui hoje, superando as mais diversas dificuldades desta jornada.

À Universidade Federal de Minas Gerais e à Escola de Veterinária, pela oportunidade de realizar o curso.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus amados pais, Magali Haddad e José Luiz de Oliveira, pela dedicação, apoio e amor incondicionais.

À minha avó Noemi, meu anjo da guarda que sempre me acompanha e protege.

A toda a minha família, apesar da distância, a presença de vocês é sempre constante. Ao Felipe, meu sobrinho e afilhado lindo, por ter trazido tanta felicidade.

À minha orientadora, Professora Monique de Albuquerque Lagares, pela orientação e ensinamentos.

À banca examinadora, Professor Rubens Paes de Arruda, do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal – USP, Professor Marc Henry, UFMG e Guilherme Ribeiro Valle, PUC-Betim.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, do Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ Minas, pelo auxílio nas análises no citômetro de fluxo. Agradeço a Tisa, Márcio e Lisiane pela receptividade e disponibilidade.

À Professora Cleuza Maria de Faria Rezende, chefe do Departamento de Cirurgia e Clínica Veterinárias da Escola de Veterinária – UFMG, pelo auxílio na aquisição de reagentes.

À Professora Cristina Guatimosin Fonseca, do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG e à Professora Fernanda Landim-Alvarenga, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, pela doação de reagentes.

Ao Professor Marcos Xavier Silva, professor visitante do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária – UFMG, ao Danilo e ao Jorge (colega de pós-graduação), pelas sugestões e execução das análises estatísticas.

À Professora Gilcinéa de Cássia Santana, do Departamento de Cirurgia e Clínica Veterinárias, da Escola de Veterinária – UFMG, pela indicação do Dr. Olindo.

Ao Ângelo Márcio, do Departamento de Química – UFMG, por me apresentar a ciclodextrina.

Às Médicas Veterinárias Lolô, Raquel, Virgínia e a todos que se empenharam para conseguir os animais utilizados neste experimento.

A todos os proprietários dos garanhões que disponibilizaram os animais: Ana Maria, Ramon, Tiago (Fazenda Sonora), Trajano (Haras Cruz Alta), Paulino (Haras do Lay), Haroldo (Haras Lagoa Santa) e Dr. Júlio (Haras dos Plácidos).

Aos meus irmãos de orientação, Fabiana e André, por tudo o que fizeram por mim, sempre serei grata.

Ao Fernando, Kate, Baity, Naninha, Camila Domingues, amigos fiéis e verdadeiros que literalmente me carregaram no colo quando eu mais precisei. Vocês também são responsáveis por eu ter chegado até aqui.

Aos professores do Setor de Reprodução da Escola de Veterinária, Alan Maia Borges, Antônio de Pinho Marques Júnior, Vicente Ribeiro do Vale Filho, principalmente ao Professor José Monteiro da Silva Filho, pelos ensinamentos, pelo exemplo profissional e pela doação de materiais de consumo para a realização do experimento.

Às secretárias do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, D. Lourdes, Rosângela e Eliane, pela colaboração.

Ao pessoal do Centro de Esterilização da Escola de Veterinária pela boa vontade de sempre.

À equipe do Colegiado de Pós-Graduação.

Aos animais, sem os quais nada disso seria possível.

Meus sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pg.
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Morfologia Espermática.....	14
2.2 Membrana Plasmática.....	15
2.3 Capacitação Espermática e Reação Acrossômica.....	17
2.4 Princípios da Criopreservação.....	23
2.5 Procedimentos utilizados na criopreservação do sêmen eqüino.....	27
2.6 Criocapacitação.....	33
2.7 Reação Acrossômica Induzida.....	35
2.8 Funções do colesterol na criopreservação celular.....	36
2.9 Avaliação Espermática.....	44
3. MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 Coleta do sêmen.....	49
3.2 Avaliação espermática do sêmen fresco.....	49
3.3 Avaliação microbiológica dos meios diluidores.....	49
3.4 Congelamento do sêmen.....	50
3.5 Avaliação espermática pós-descongelamento.....	51
3.6 Indução da Reação Acrossômica (RAI)	53
3.7 Análises Estatísticas.....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5. CONCLUSÕES	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	81
1. Meios Diluidores.....	81
2. Ficha do experimento.....	82
3. Protocolo FITC-PNA/IP – Citometria de fluxo.....	83
4. Protocolo de reação acrossômica induzida (RAI).....	84

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1. Morfologia do espermatozóide eqüino.....	15
Figura 2. Organização da membrana plasmática; modelo “mosaico fluido”	17
Figura 3. Adesão de proteínas do plasma seminal à membrana plasmática (decapacitação espermática); Espermatozóide capacitado nos fluidos do trato feminino.....	19
Figura 4. Seqüência da capacitação espermática.	21
Figura 5. Seqüência da reação acrossômica.	23
Figura 6. Representação esquemática das mudanças físicas no espermatozóide eqüino durante o congelamento.....	26
Figura 7. Fórmula estrutural da β -ciclodextrina	40
Figura 8. Estrutura da ciclodextrina na forma de um cone truncado.....	41
Figura 9. Esquema representativo do experimento.....	52
Figura 10. Dot Plots de citometria de fluxo com coloração IP e FITC-PNA. (A) Pós-descongelamento e (B) Pós-RAI.....	63

LISTA DE TABELAS

	Pg.
Tabela 1. Parâmetros de avaliação do sêmen fresco.....	55
Tabela 2. Motilidade progressiva durante as etapas do processo de congelamento, nos diferentes tratamentos (média \pm DP).....	56
Tabela 3. Médias (\pm DP) da motilidade progressiva, vigor e integridade de membrana plasmática (citometria de fluxo e HOST) de espermatozoides criopreservados.....	57
Tabela 4. Porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática íntegra pós-descongelamento e pós-RAI (média \pm desvio-padrão).	61
Tabela 5. Porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossoma íntegros, com reação acrossômica espontânea pós-descongelamento e com reação acrossômica positiva pós-RAI com o ionóforo de cálcio A23187, do número total de espermatozoides (média \pm desvio-padrão).....	62
Tabela 6. Taxas de reação acrossômica do número de espermatozoides com membrana plasmática íntegra pós-descongelamento e pós-RAI (média \pm desvio-padrão).....	65

RESUMO

A inclusão de colesterol no diluidor tem sido reportada como uma alternativa para aumentar a estabilidade das membranas do espermatozóide de diversas espécies durante a criopreservação. No entanto, a fertilidade *in vivo* é reduzida em comparação ao sêmen congelado sem a inclusão do colesterol. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a motilidade progressiva, a integridade funcional e física da membrana plasmática (teste hiposmótico e coloração de Iodeto de Propídeo, respectivamente), a integridade do acrossoma (coloração com FITC-PNA) e a capacidade do espermatozóide em sofrer a reação acrossômica (induzida com ionóforo de cálcio A23187), após inclusão e remoção do colesterol de suas membranas. Para tal, foi congelado um ejaculado de 12 garanhões. O sêmen foi submetido a quatro tratamentos: (1) congelamento convencional; (2) sêmen acrescido de colesterol; (3) tratamento 2 com a remoção do colesterol pós-descongelamento com 0,052 mg de metil- β -ciclodextrina/50 x 10⁶ espermatozóides; (4) tratamento 2 com a remoção de colesterol pós-descongelamento com 0,156 mg de metil- β -ciclodextrina/50 x 10⁶ espermatozóides. Não foi observada diferença quanto a motilidade progressiva e funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozóides entre os tratamentos. No entanto, foi observada redução da integridade da membrana plasmática nos tratamentos 1, 3 e 4, quando comparados ao tratamento 2, sugerindo um efeito tóxico da ciclodextrina nos dois últimos tratamentos. A inclusão do colesterol aumentou a porcentagem de espermatozóides com acrossoma íntegro após a indução da reação acrossômica. Entretanto, não foi observada redução da porcentagem de espermatozóides com acrossoma íntegro quando foi realizada a indução de sua remoção com as duas concentrações de ciclodextrina. Visto que a taxa de reação acrossômica induzida *in vitro* pode ser indicativo da fertilidade *in vivo*, mais estudos devem ser realizados para aumentar a taxa de reação acrossômica *in vitro* sem que haja redução de integridade de membrana plasmática.

Palavras-chave: equino, sêmen congelado, metil- β -ciclodextrina, colesterol.

ABSTRACT

Cholesterol incorporation to the sperm membranes has been reported as an alternative to improve the membrane stability of several species' spermatozoa during the cryopreservation. However, *in vivo* fertility is reduced compared to cryopreservation of control sperm (without cholesterol). The aim of the present study was to evaluate the progressive motility, the functional and physical integrity of the plasma membrane (hyposmotic swelling test and evaluation with Propidium iodide, respectively), the acrossomal integrity (evaluation with FITC-PNA) and the ability of sperm to acrosome react (induction of the acrosome reaction with calcium ionophore - A23187), after incorporating and removing the cholesterol from sperm membranes. One ejaculate of twelve stallions was collected. Semen was submitted to four treatments: (1) conventional cryopreservation; (2) semen treated with cholesterol; (3) treatment 2 following removal of the cholesterol post-thawing with 0,052 mg of methyl- β -cyclodextrin/50 x 10⁶ sperm; (4) treatment 2 following removal of the cholesterol post-thawing with 0,156 mg of methyl- β -cyclodextrin/50 x 10⁶ sperm. No differences were observed in relation to progressive motility and plasma membrane functionality of sperm between treatments. However, it was observed fewer sperm with intact plasma membrane in treatments 1, 3, and 4, when compared to treatment 2, suggesting a toxic effect of cyclodextrin in the last two treatments. Cholesterol incorporation increased the percentage of sperm with intact acrosome after induction of the acrosome reaction. Nevertheless, no reduction was observed in the rates of sperm with intact acrosome after cholesterol removal with the two different cyclodextrin concentrations. Since induced acrosome reaction rate *in vitro* can be indicative of *in vivo* fertility, more studies should be performed to enhance the acrosome reaction rate *in vitro* without reducing plasma membrane integrity.

Key-words: equine, cryopreserved semen, methyl- β -cyclodextrin, cholesterol.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a aplicação de biotécnicas vem trazendo avanços consideráveis para a reprodução de diversas espécies animais. A inseminação artificial com sêmen congelado é um dos passos mais importantes neste avanço, pois garante um ganho genético muito mais rápido do que aquele obtido com sêmen fresco (Pickett e Amann, 1992; Graham, 1996). Outras vantagens são a continuidade da reprodução mesmo com o reprodutor participando de competições esportivas, a garantia de armazenamento do sêmen, excluindo qualquer impossibilidade por injúria ou morte, além da comercialização de sêmen independentemente de distâncias geográficas, sem perda da viabilidade espermática (Pickett e Amann, 1992; Graham, 1996). Entretanto, com exceção dos bovinos, a utilização de sêmen congelado não é freqüente na inseminação artificial de animais domésticos, pois os protocolos de congelamento disponíveis não proporcionam taxas de prenhez satisfatórias (Parks e Graham, 1992). Em eqüinos, a técnica de congelamento de sêmen não está totalmente otimizada, devido a diferenças individuais de congelabilidade espermática entre garanhões e entre ejaculados do mesmo indivíduo. Além disso, em média, metade

dos espermatozóides morre durante esse processo e a outra metade pode apresentar danos, o que resulta na reduzida viabilidade dos espermatozóides no trato reprodutivo da fêmea e, conseqüentemente, baixa taxa de prenhez (Watson, 1995).

O sucesso na criopreservação do sêmen depende da qualidade do sêmen fresco, de interações entre diluidores, crioprotetores e curvas de congelamento e descongelamento, buscando minimizar os danos causados pelo choque térmico, formação de cristais de gelo, efeito solução e desidratação (Pickett e Amann, 1992; Jasko, 1994). Além disso, alterações nos espermatozóides semelhantes às que ocorrem durante o processo da capacitação espermática, denominada de criocapacitação (Pommer e Meyers, 2002), têm sido associadas com danos causados pela criopreservação (Watson, 2000; Meyers et al., 2003). Uma vez ocorrendo capacitação espermática prematura, não é mais possível que o espermatozóide realize a fecundação e, conseqüentemente, ocorrerá redução da fertilidade do animal (Neild et al., 2002; Meyers et al., 2003). Uma das características da membrana plasmática que pode conferir uma maior sensibilidade a redução de temperatura é a proporção de colesterol:fosfolipídio. A espécie suína apresenta espermatozóide com a menor

proporção colesterol:fosfolípido, sendo a mais sensível à redução de temperatura necessária aos processos de criopreservação (Amann e Pickett, 1987; Amann e Graham, 1992). A inclusão de colesterol no diluidor tem sido reportada como uma alternativa para aumentar a estabilidade da membrana plasmática do espermatozóide de diversas espécies durante o resfriamento, conseqüentemente, melhorando a qualidade seminal (Combes et al., 2000; Purdy e Graham, 2004a; Purdy e Graham, 2004b; Moore et al., 2005a e Álvarez et al., 2006). No entanto, éguas inseminadas com o sêmen acrescido de diluidor contendo colesterol apresentaram fertilidade inferior quando comparadas às éguas do grupo controle (Zahn et al., 2002).

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito crioprotetor da inclusão de colesterol nas membranas espermáticas antes do congelamento sobre a motilidade, integridade funcional e física da membrana plasmática pós-descongelamento; bem como o efeito da remoção do colesterol do sêmen descongelado sobre a capacidade do espermatozóide equino sofrer reação acrossômica por meio da indução desse processo com o ionóforo de cálcio A23187.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfologia Espermática

Os espermatozoides são células alongadas, consistindo de cabeça, contendo um núcleo, e uma cauda (Figura 1) (Eddy e O'Brien, 1994; Hafez, 1995). A cabeça apresenta forma oval e achatada, contendo cromatina altamente compacta ou condensada que compreende um complexo DNA, com uma classe especial de proteínas denominadas protaminas espermáticas (Barth e Oko, 1989; Hafez, 1995). O acrossoma é uma estrutura de dupla parede situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo, derivada do Complexo de Golgi gerado durante a espermiogênese. O acrossoma possui enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fecundação e oferece proteção ao DNA contra choques mecânicos (Eddy e O'Brien, 1994; Hafez, 1995). O colo conecta a cabeça do espermatozóide à cauda (flagelo), que é subdividida em peça intermediária, principal e terminal (Hafez, 1995). O colo ou peça de conexão forma uma placa que se ajusta dentro de uma depressão na superfície do núcleo (Eddy e O'Brien, 1994) e é contínua com nove feixes de fibras que posteriormente se projetam através da maior parte da cauda. A peça intermediária, localizada entre o colo e o annulus, juntamente com o comprimento total da cauda, formam o axonema (Hafez,

1995). Na peça intermediária existe um grande número de mitocôndrias que se encontram dispostas em forma de hélice, possuindo a função de produzir a energia necessária para a motilidade espermática (Eddy e O'Brien, 1994). O axonema, uma estrutura complexa composta por duas proteínas principais, a dineína e a tubulina (Alberts, 2004), está envolvido no mecanismo de motilidade espermática. Este apresenta nove pares de microtúbulos periféricos além da presença de um par central. Para ação direta deste movimento a dineína e a tubulina utilizam adenosina trifosfato (ATP), o qual é produzido através

das mitocôndrias presentes na peça intermediária (Hafez, 1995).

2.2 Membrana Plasmática

A membrana plasmática engloba a célula, envolve todas as estruturas espermáticas, define os seus limites e mantém as diferenças entre o citosol e o ambiente extracelular (Amann e Graham, 1992; Alberts et al., 2004). É composta de moléculas lipídicas e protéicas, unidas principalmente por ligações não-covalentes. A bicamada lipídica ficou estabelecida definitivamente como a base universal da estrutura das membranas celulares.

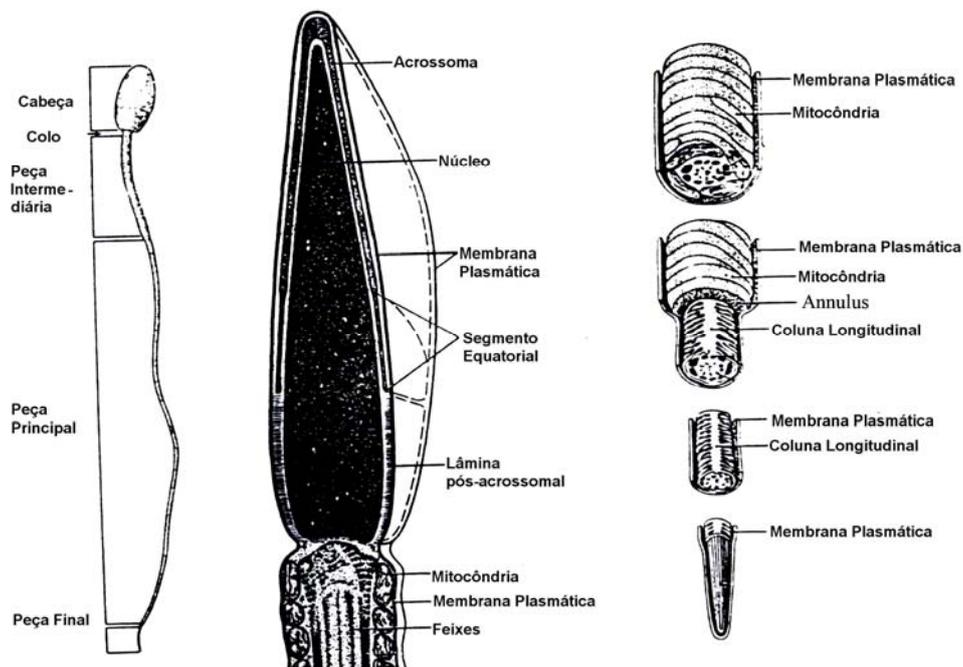


Figura 1. Morfologia do espermatozóide equino (Amann e Pickett, 1987).

Todas as moléculas lipídicas são anfipáticas, ou seja, possuem uma extremidade hidrofílica ou polar, voltada para o meio externo e uma extremidade hidrofóbica ou apolar, voltada para o meio interno (Figura 2) (Squires et al., 1999; Alberts et al., 2004). Os lipídios de membrana mais abundantes são os fosfolipídios, predominantemente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomielina, compostos de uma cabeça polar e duas caudas de hidrocarboneto de característica hidrofóbica. 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 glicolipídios estão localizados na superfície da membrana, enquanto que o colesterol preenche os espaços entre as cadeias de ácidos graxos de fosfolipídios, estabilizando a membrana (Figura 2) (Parks e Graham, 1992; Squires et al., 1999). As proteínas estão entremeadas aos fosfolipídios (Amann e Pickett, 1987; Hafez, 1995), desempenhando a maioria das funções específicas da membrana (Alberts et al., 2004). Estas representam pouco mais de 50% do peso da maioria das membranas e são classificadas como integrais ou periféricas. As proteínas

integrais servem como poros ou canais de membrana, receptores para íons e outras moléculas. Muitas proteínas integrais e periféricas contêm cadeias de carboidratos (Amann e Pickett, 1987; Amann e Graham, 1992; Squires et al., 1999), sendo denominadas de glicoproteínas (Figura 2). A membrana não é estática. Geralmente todos os componentes estão dispostos aleatoriamente e são livres para movimentarem-se lateralmente. Isso porque a membrana é fluida a temperatura ambiente, denominado estado líquido-cristalino (Parks e Graham, 1992; Squires et al., 1999). A proporção de colesterol:fosfolipídios, assim como a natureza dos fosfolipídios e a temperatura determinam a fluidez da membrana. Em geral, quanto mais colesterol presente, menos flexível ou menos fluida é a porção da membrana (Amann e Pickett, 1987; Amann e Graham, 1992).

Devido às diferenças na composição da membrana plasmática, cada compartimento exhibe propriedades físicas bastante diferentes (Squires et al., 1999). Existem dados limitados sobre a composição da membrana plasmática do garanhão. A proporção colesterol:fosfolipídio é 0,36 (Darin-Bennett e White, 1977 e Cross, 1998), um valor intermediário quando comparado com valores de varrões e touros

(Amann e Graham, 1992; Parks e Lynch, 1992).

2.3 Capacitação Espermática e Reação Acrossômica

Os espermatozoides ejaculados dos mamíferos são incapazes de fecundar oócitos, sem que antes sofram algumas

modificações no trato reprodutivo feminino (Amann e Graham, 1992; Delpech e Thibault, 1993; Bedford et al., 2003; Gadella e Colenbrander, 2003). Esse processo é denominado capacitação espermática (Bedford, 1983; Delpech e Thibault, 1993; Bazer et al., 1995; Senger, 2003).

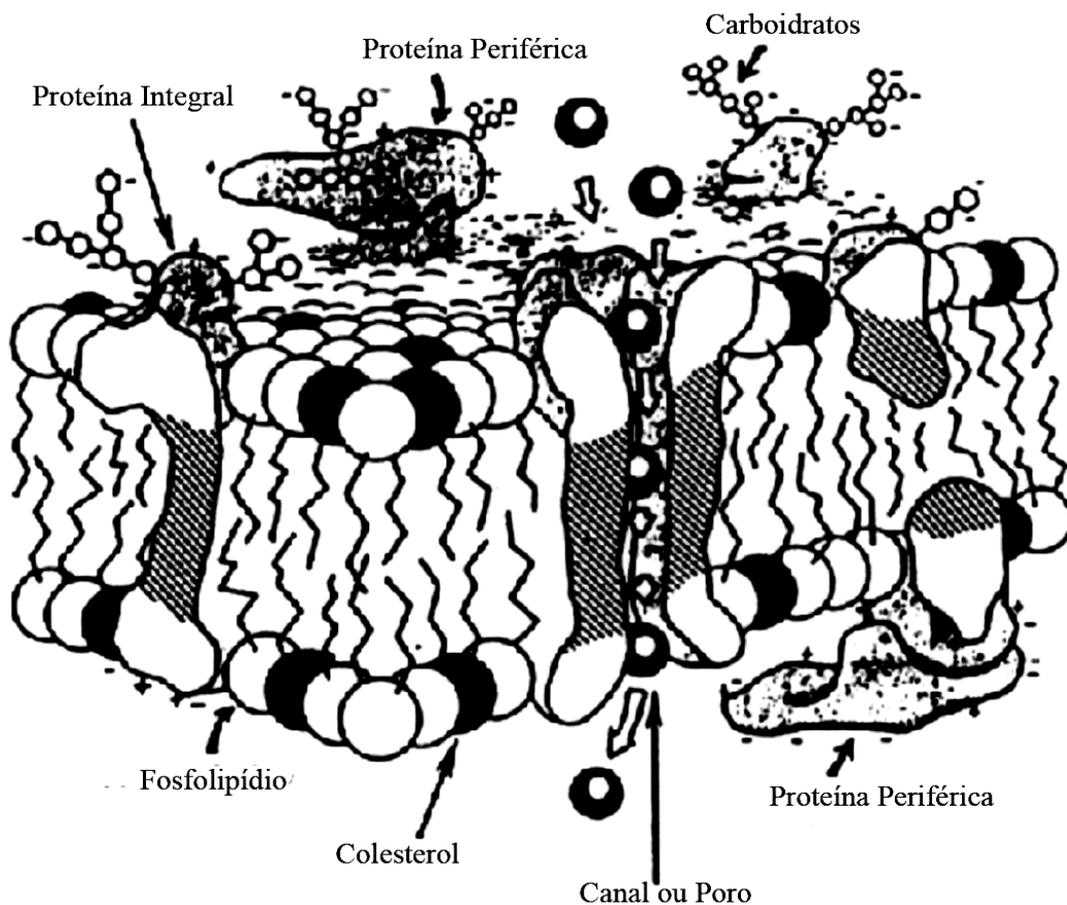


Figura 2. Organização da membrana plasmática; modelo “mosaico fluido” (Zafian, 1984).

O principal local de capacitação parece ser a tuba uterina, especificamente a região do istmo (Bazer et al., 1995), não sendo um processo espécie-específico (Delpech e Thibault, 1993). As maiores modificações envolvem alterações nos componentes da membrana espermática, que podem ser modificados ou removidos por secreções do trato genital feminino, provocando a desestabilização da bicamada lipídica. Conseqüentemente, ocorrerá fusão da membrana plasmática com a membrana acrossômica externa, iniciando-se a reação acrossômica (Amann e Graham, 1992; Delpech e Thibault, 1993; Bazer et al., 1995). Finalmente, ocorrem alterações na motilidade, resultando em hiperativação do espermatozóide (Bedford, 1983; Amann e Graham, 1992; Delpech e Thibault, 1993). Embora o trato genital feminino forneça substratos energéticos para o espermatozóide, o útero não é um ambiente ótimo. Para manter a integridade da membrana durante o transporte pelo trato genital feminino, proteínas do plasma seminal se aderem à membrana espermática, formando uma capa de glicoproteínas. Esse processo é denominado de decapacitação espermática. “*In vivo*”, o

espermatozóide passa do plasma seminal para os fluidos do trato feminino (Figura 3) (Delpech e Thibault, 1993; Senger, 2003).

Neste momento, essa 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, podendo restringir a motilidade hiperativa flagelar. Mudanças similares ocorrem nas porções caudal e rostral da cabeça do espermatozóide, precedendo a reação acrossômica e nas peças intermediária e principal, antecedendo a hipermotilidade (Amann e Graham, 1992; Visconti e Kopf, 1998). “*In vitro*”, a remoção do plasma seminal por centrifugação ou migração espontânea é uma condição *sine qua non* para o processo de capacitação. Contudo, a capacitação pode ser revertida, ressuspendendo o espermatozóide capacitado no plasma seminal ou nos diluidores de sêmen. Dessa maneira, este se torna decapitado e requer tempo adicional para capacitação antes de reaver sua fertilidade (Delpech e Thibault, 1993; Senger, 2003).

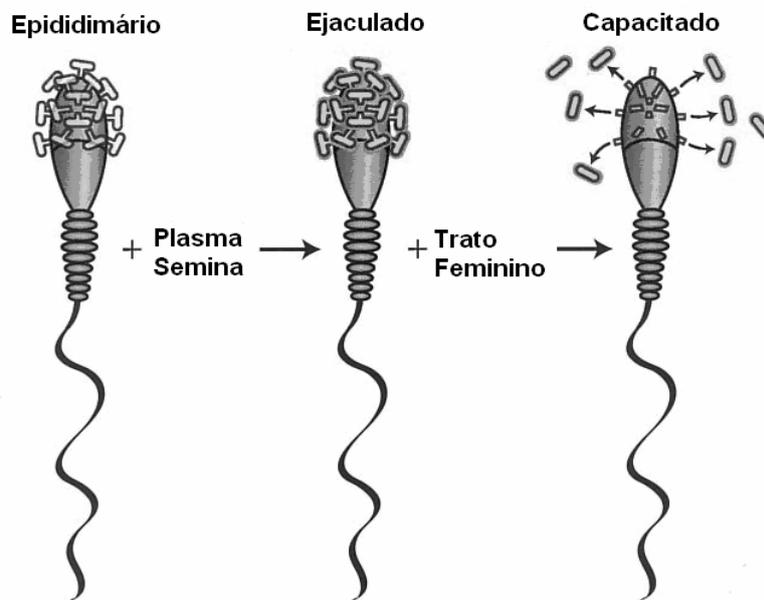


Figura 3. Adesão de proteínas do plasma seminal à membrana plasmática (decapacitação espermática); Espermatozóide capacitado nos fluidos do trato feminino (Senger, 2003).

Mudanças nos componentes da membrana espermática seguem-se progressivamente: perda de proteínas ou redução de seu peso molecular, redução da proporção de colesterol:fosfolípido, aumento da mobilidade lateral de lipídios e proteínas (Delpech e Thibault, 1993; Gadella et al., 2001). As proporções de colesterol:fosfolípidios na membrana plasmática e na membrana acrossômica externa diminuem, aumentando sua fluidez (Delpech e Thibault, 1993). O efluxo de colesterol ocorre devido sua transferência para albuminas e lipoproteínas de alta densidade da tuba uterina (Amann e Graham, 1992; Delpech e Thibault, 1993; Gadella et al.,

2001). O colesterol tem uma importante função na estabilização de membranas. 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). Há evidências de que o bicarbonato também facilite a desorganização da membrana (Colenbrander et al., 2001; Gadella et al., 2001), principalmente na região apical da cabeça do espermatozóide (Gadella e Colenbrander, 2003). Conseqüentemente, foi sugerido que a capacitação das células

espermáticas dos mamíferos “*in vivo*” fosse dependente de bicarbonato, supostamente presente em níveis maiores na tuba uterina (20 mM) do que no fluido espermático (<1 mM) (Flesch e Gadella, 2000; Colenbrander et al., 2001; Gadella e Colenbrander, 2003). As respostas induzidas pelo bicarbonato podem diferir de acordo com as regiões da célula espermática, como cabeça e cauda (Visconti e Kopf, 1998; Gadella e Colenbrander, 2003). O bicarbonato estimula uma forma solúvel de adenilciclase (AC), abundante nos espermatozóides, resultando no aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) que ativa uma proteína quinase A (PKA) que, por sua vez, induz a fosforilação de tirosina de vários substratos (Visconti e Kopf, 1998; Flesch e Gadella, 2000; Gadella e Colenbrander, 2003). Em consequência, as proteínas da membrana plasmática, relacionadas com a ligação na zona pelúcida se tornam ativadas. Além disso, a fosfolipase C (PLC) do citosol é fosforilada e translocada para a membrana plasmática (Figura 4) (Flesch e Gadella, 2000; Gadella et al., 2001). Estudos de Colenbrander et al. (2001) e Flesch et al. (2001) demonstraram a presença de colesterol pela superfície da cabeça do espermatozóide na ausência de bicarbonato e nas regiões apical, equatorial e pós-acrossomal, em sua presença. A

desestabilização afeta a porção lipídica da membrana, alterando a permeabilidade iônica, particularmente do cálcio, e as propriedades da capacidade de fusão da membrana, as quais são importantes para a reação acrossômica (Amann e Graham, 1992).

Como todas as células sob condições aeróbicas, os espermatozóides são capazes de gerar radicais livres (Ball et al., 2002; Baumber et al., 2003), em sua maioria originados de atividade metabólica normal (de Lamirande et al., 1997). Radicais livres como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO_3), induzem hiperativação, capacitação e reação acrossômica “*in vitro*” (de Lamirande et al., 1997). Embora em altas concentrações sejam prejudiciais ao espermatozóide, em baixas concentrações têm um papel importante na função espermática, especificamente na fosforilação de tirosina (de Lamirande et al., 1997; Ball et al., 2002; Baumber et al., 2002; Baumber et al., 2003). Esta fosforilação media uma variedade de funções celulares, como regulação do crescimento, controle de ciclos celulares, regulação de íons, formação do citoesqueleto, além de ser um componente essencial à capacitação espermática (Visconti e Kopf, 1998; Meyers et al.,

2003). As enzimas responsáveis pela fosforilação-desfosforilação da tirosina de proteínas espermáticas são possíveis alvos para os radicais livres (de Lamirande et al., 1997).

Segundo Gadella e Colenbrander (2003) o bicarbonato agiria na cauda espermática levando a fosforilação da tirosina, induzindo a hipermotilidade. Esta se caracteriza por aumento da amplitude do batimento flagelar, devido a maior flexibilidade principalmente na peça intermediária, e mudança do movimento progressivo que se torna circular, devido a não rotação da cabeça do espermatozóide (Bedford, 1983; Delpech e Thibault, 1993). Os processos de hiperativação e capacitação espermática envolvem mecanismos distintos (Bedford, 1983; Amann e Graham,

1992; Delpech e Thibault, 1993). A liberação de colesterol e a redistribuição de proteínas da membrana plasmática permitem a abertura dos canais de cálcio e, conseqüentemente, o aumento do cálcio intracelular.

Contudo, há evidências de que a hiperativação esteja mais diretamente relacionada aos níveis de AMPc do que com o influxo de cálcio. Um aumento progressivo nos níveis de AMPc, o qual é cálcio dependente, precede o início da motilidade hiperativada (Delpech e Thibault, 1993). Bedford (1983) sugeriu que a hiperativação maximiza a chance de contato dos poucos espermatozóides presentes na ampola com o oócito e ajuda no transporte espermático do istmo para a ampola, facilitando a penetração no oócito.

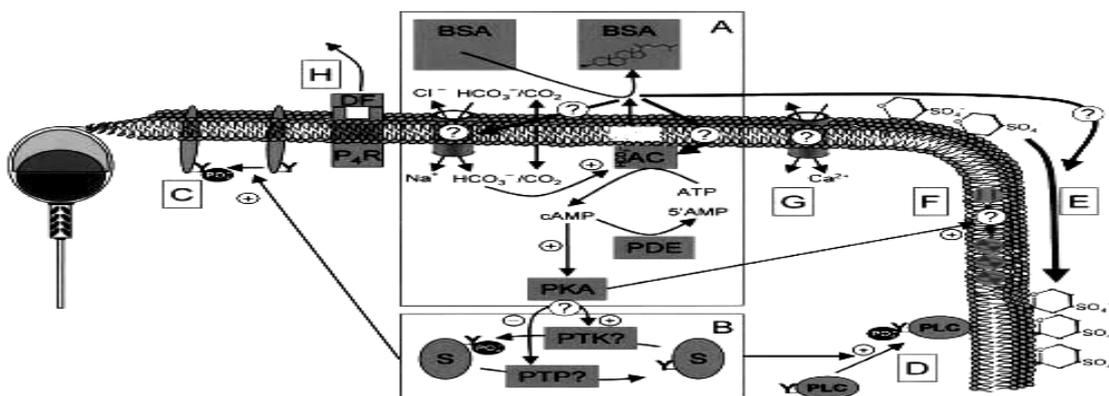


Figura 4. Sequência da capacitação espermática. (A) Bicarbonato pode entrar na célula espermática através dos canais iônicos. O bicarbonato intracelular estimula a AC e a simultânea produção de AMPc ativa a PKA. O efluxo de colesterol pode aumentar a entrada de bicarbonato e afetar a AC. (B) A PKA induz 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 fosfolipídios. (F) O efluxo de colesterol está envolvido com as mudanças da membrana. (G) A entrada de pequenas quantidades de cálcio nas células espermáticas tem uma função importante na capacitação. (H) Fatores decapacitantes (DF) são removidos da superfície da célula espermática, expondo os receptores de progesterona (Flesch e Gadella, 2000).

Embora a duração do processo de capacitação “*in vitro*” tenha sido determinada para várias espécies, o tempo requerido para a capacitação “*in vivo*” não é conhecido para todas (Amann e Graham, 1992). Acredita-se que seja dependente do balanço de estrógeno/progesterona (Delpech e Thibault, 1993).

A capacitação acarreta modificações no acrossoma necessárias à reação acrossômica (Amann e Graham, 1992; Bazer et al., 1995; Colenbrander et al., 2001; Gadella et al., 2001 e Gadella e Colenbrander, 2003). Portanto, as etapas da capacitação previnem a ativação prematura do acrossoma, até que o espermatozóide atinja o local de fecundação do oócito, na ampola da tuba uterina (Bazer et al., 1995).

A heparina também é capaz de estimular a capacitação e a reação acrossômica, removendo substâncias do plasma seminal da superfície do espermatozóide, os fatores decapacitantes, sem os quais os espermatozóides se tornam aptos para sofrer o processo de capacitação (Yanagimachi, 1994). Outros estudos sugerem que a heparina ligada a superfície do espermatozóide aumenta as concentrações de cálcio e o pH intracelular, e ainda facilita o desligamento do

espermatozóide da tuba uterina (Parrish et al., 1994).

Com os receptores ZP espermáticos expostos, as proteínas da zona pelúcida (ZP) se ligam, promovendo a agregação e a fosforilação da tirosina. 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. O pH intracelular aumenta por meio da proteína G e o potencial de membrana despolariza. Esse aumento do pH, juntamente com a despolarização da membrana, promovem maiores concentrações de cálcio intracelular, que por sua vez ativa a translocação da PLC para a membrana plasmática durante a capacitação. O aumento do cálcio intracelular ativa a fosfolipase A (PLA) que degrada os fosfolípidios em ácidos graxos livres e, conseqüentemente, estimulam uma proteína kinase C (PKC). Essas alterações são necessárias para a fusão da membrana plasmática a membrana acrossômica externa (reação acrossômica), que promove a subsequente secreção de enzimas acrossômicas (Figura 5) (Flesh e Gadella, 2000).

2.4 Princípios da Criopreservação

O desafio da célula espermática durante o processo de congelamento não é sua habilidade em resistir à temperatura de armazenamento de -196°C , mas sim sua capacidade de suportar mudanças que ocorrem durante as zonas intermediárias de temperatura ($+19^{\circ}\text{C}$ a $+8^{\circ}\text{C}$ e -15°C a -60°C), pela qual elas devem passar duas vezes, durante o congelamento e o descongelamento (Mazur, 1984).

No processo de criopreservação, o sêmen deve ser primeiramente resfriado da

temperatura corpórea (37°C) à temperatura ambiente (20°C). Este resfriamento aparentemente não causa danos aos espermatozoides, desde estes estejam diluídos em meio adequado. Existe, porém, uma faixa crítica de temperatura no processo de refrigeração, entre $+19$ e $+8^{\circ}\text{C}$, em que o espermatozoide pode ser severamente lesado (Moran, 1992).

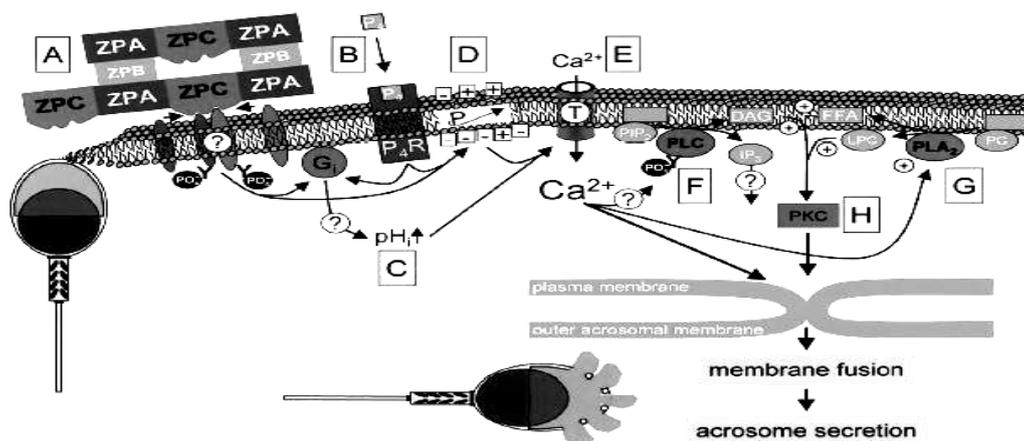


Figura 5. Seqüência da reação acrossômica. (A) as proteínas da zona pelúcida (ZP) se ligam aos receptores espermáticos, promovendo a agregação e a fosforilação da tirosina. (B) O ambiente das ZP contém alta concentração de progesterona, que pode se ligar a um receptor na superfície espermática. Ambos, 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 quinase C (PKC) (Flesh e Gadella, 2000).

Se esse resfriamento for realizado de maneira inadequada, ocorre um fenômeno chamado choque térmico (Watson, 1995; Watson, 2000). Este induz a prejuízos

irreversíveis como rápida perda de motilidade, movimento circular, redução do metabolismo espermático, danos à membrana plasmática decorrente de

aumento da permeabilidade, com conseqüente perda de íons e moléculas intracelulares e danos acrossômicos (Amann e Pickett, 1987; Pickett e Amann, 1992), como edemaciamento e irregularidades do acrossoma (Watson, 1995). O resfriamento nesta faixa de temperatura (+19 e +8°C), faz com que os lipídios da membrana plasmática passem por uma fase de transição do estado líquido-cristalino para o estado de gel (Graham, 1996). Quando o sêmen é resfriado abaixo de 5°C, inicialmente o meio que circunda o espermatozóide e eles próprios permanecem descongelados, porque seu ponto de congelamento é abaixo de 0°C, apenas ocorrendo um super-resfriamento (Amann e Pickett, 1987). De -6°C a -15°C, a água no meio começa a cristalizar e a concentração de soluto na fração descongelada aumenta, enquanto a membrana plasmática impede formação de cristais de gelo intracelular. A água dentro da célula espermática permanece descongelada (Hafez, 1995; Graham, 1996). Uma vez que as células alcançam a temperatura crítica (-60°C) (Parks e Graham, 1992; Hafez, 1995; Graham, 1996), o espermatozóide é relativamente inerte e o sêmen pode ser imerso em nitrogênio líquido, para seu armazenamento (Graham, 1996).

Quando uma solução é refrigerada abaixo do seu ponto de congelamento, a água pura se cristaliza (Graham, 1996; Neild et al, 2002; Meyers et al., 2003) e os solutos na fração de água líquida remanescente aumentam a pressão osmótica no espaço extracelular (Amann e Pickett, 1987; Amann e Graham, 1992). Mesmo a temperatura de -196°C ainda existem canais de água descongelada, contendo concentrações de sais extremamente altas. A concentração de sais numa solução fisiológica, que é em torno de 0,15M em temperatura ambiente, pode aumentar até 2,6M quando a temperatura é reduzida para -10°C (Mazur, 1977). Somente espermatozoides que residem nesses canais sobrevivem a criopreservação (Amann e Pickett, 1987).

Segundo bases físico-químicas, a lesão celular causada durante os processos de congelamento e descongelamento é devida à formação de cristais de gelo intracelular, que afetam a estrutura da célula, a concentração de solutos resultante do congelamento da água pura e a interação destes dois fatores. As altas concentrações de sais no meio durante o congelamento podem desidratar o espermatozóide, levando a deformações celulares, danos à estrutura da membrana, deslocamento e desnaturação de proteínas da mesma, e

desarranjo de estruturas do citoesqueleto (Amann e Pickett, 1987; Graham, 1996; Watson, 2000).

Com a redução da temperatura, a concentração de soluto no meio extracelular aumenta, a água sai das células e forma cristais de gelo intracelulares, dependendo da curva de resfriamento (Mazur, 1984). No resfriamento lento (-25 a -40°C / min), o espermatozóide se desidrata devido à alta concentração de solutos no meio extracelular. Conseqüentemente, não se formam grandes cristais de gelo intracelulares (Amann e Pickett, 1987). Esta desidratação pode resultar em altas concentrações intracelulares de soluto, provocando o chamado efeito solução, prejudicial às células espermáticas (Watson, 1995). Por outro lado, numa curva de resfriamento muito rápida (> -60°C / min), a água não tem tempo para sair da célula e, em algum ponto abaixo de -10°C, a célula sofrerá o congelamento interno. A extensão dos danos causados pelo gelo intracelular depende do grau de formação de gelo e do tamanho dos cristais. Grandes cristais podem causar danos mecânicos às células, sendo uma das principais causas de morte celular durante o congelamento, enquanto os pequenos cristais podem não ser deletérios. Durante o reaquecimento, porém, o crescimento desses pequenos

cristais em decorrência da recristalização pode causar danos severos (Mazur, 1984).

A curva de descongelamento depende da curva de congelamento. Espermatozoides congelados numa curva lenta requerem uma curva de descongelamento lenta, para permitir o descongelamento dos cristais de gelo extracelulares. O descongelamento desses cristais provoca a diluição dos solutos e lentamente ocorre a reidratação das células. Se o sêmen for descongelado muito rapidamente, os cristais extracelulares descongelam-se muito rapidamente e a água do meio invade bruscamente as células, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática (Amann e Pickett, 1987; Holt, 2000). As células congeladas numa curva rápida necessitam de uma curva rápida de descongelamento, de modo que o gelo intracelular que se formou durante o congelamento não tenha tempo para recristalizar-se (Figura 6) (Amann e Pickett, 1987; Pickett e Amann, 1992; Graham, 1996).

Dentre os fatores que afetam o descongelamento estão o tipo de envase, espessura da parede da palheta e condutividade de calor, e a temperatura (Amann e Pickett, 1987). Temperatura alta, como 75 °C por 7 segundos (Cochran et al.,

1984; Arruda et al., 1986), seguido de imersão imediata em banho-maria a 37°C por, no mínimo, mais 5 segundos promovem maior viabilidade e motilidade espermáticas pós-descongelamento comparada a temperatura e tempo utilizados rotineiramente (37°C, 30 segundos) (Holt, 2000).

Para fecundar um oócito, o espermatozóide precisa apresentar pelo menos quatro atributos pós-descongelamento:

metabolismo para a produção de energia; motilidade progressiva; enzimas acrossomais intactas, necessárias para a penetração do espermatozóide 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).

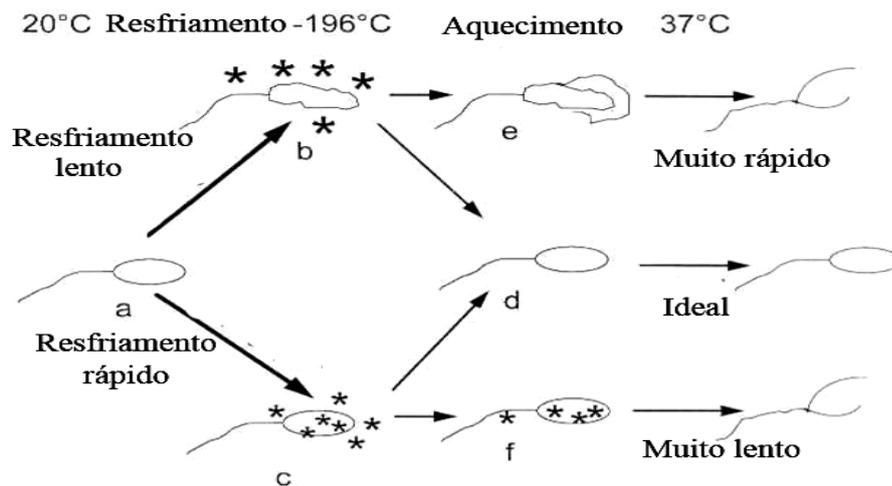


Figura 6. Representação esquemática das mudanças físicas no espermatozóide equino durante o congelamento (Amann e Pickett, 1987).

Vários fatores afetam a fertilidade do sêmen congelado. Dentre eles estão o animal, o crioprotetor, diferentes ejaculados, protocolo adequado e o procedimento de inseminação artificial (Amann e Pickett, 1987; Graham, 1996).

Diferentes ejaculados do mesmo garanhão e diferentes garanhões apresentam diferenças quanto à sobrevivência espermática ao processo de criopreservação. Pickett e Amann (1992) estimaram que 25% a 30% dos garanhões possuem sêmen de boa

congelabilidade, 30% a 50% apresentam moderada congelabilidade e 25% a 40%, reduzida congelabilidade. Portanto, tem sido recomendado diluidores e protocolos específicos para cada indivíduo (Graham, 1996).

2.5 Procedimentos utilizados na criopreservação do sêmen eqüino

O sêmen eqüino é coletado com vagina artificial (Amann e Pickett, 1987; Hafez, 1995) e mantido aquecido para proteger os espermatozóides do choque térmico. Após a coleta, o sêmen é avaliado (Hafez, 1995) quanto às características físicas macro e microscópicas (motilidade total, motilidade progressiva, vigor, concentração espermática, cor, aspecto). Para a criopreservação, é necessário que as características seminais estejam dentro das características mínimas requeridas para a espécie eqüina, isto é, motilidade espermática progressiva maior que 50% e concentração maior que 60 milhões de espermatozóides/mL (Jasko, 1994). Após a adição de diluidor ao sêmen, geralmente na proporção de 1:1, é preconizada a centrifugação para reduzir o percentual de plasma seminal e aumentar a concentração espermática/mL.

O plasma seminal eqüino é formado por secreções provenientes do epidídimo, ampola do ducto deferente, próstata, vesículas seminais e glândulas bulbo-uretrais. Estas secreções podem ser divididas em diferentes frações que apresentam funções diversificadas na cópula, na preservação do sêmen, no metabolismo e transporte espermático para o trato genital feminino, além de proteções imunológicas (Tischner et al, 1974; Rodger, 1975; Mann, 1975; Varner et al, 1987). Nestas diferentes frações, a pré-secreção assume a função de limpeza da uretra, apresentando alta concentração de cloreto de sódio secretados pelas glândulas bulbo-uretrais (Mann, 1975; Aurich et al, 1997). A fração rica do sêmen que possui uma grande concentração de espermatozóides contém ergotionina e glicerilfosforilcolina (GPC), além de traços de ácido cítrico. Estes componentes do sêmen têm como função proteger os espermatozóides contra agentes peroxidantes, e desempenham um papel importante no metabolismo (Marden e Werthessen, 1956). A última fração, oriunda da vesícula, contém alta concentração de ácido cítrico e pequena concentração de espermatozóides (Mann, 1975). O plasma seminal protege os espermatozóides através de processos oxidativos e fagocitários, diminuindo o crescimento de microorganismos

patogênicos (Katila, 1997). Neste contexto imunológico foi sugerido que a remoção do plasma seminal possibilitaria a ação de reações inflamatórias, uma vez que suprime a quimiotaxia dos neutrófilos “*in vitro*” (Troedsson, 1995). Entretanto, Kotilainen et al. (1994) afirmaram que não há redução do número de neutrófilos com a remoção do plasma seminal em relação à sua presença no sêmen eqüino. Efeitos negativos foram demonstrados por Lamirande et al. (1988) sugerindo que fatores do plasma seminal inibiriam a dineína ATPase, enzima responsável por ações metabólicas no axonema, bloqueando a motilidade. Além disso, foi determinado que altas concentrações de ergotionina em condições aeróbicas produziria níveis altos de peróxido de hidrogênio, o qual, atuando nas vias metabólicas, inibiria grupos sulfidril e, conseqüentemente, bloquearia parte da via aeróbica (Freud, 1973; Rodger e White, 1974; Mann, 1975; Lamirande et al., 1988). Entretanto, em concentrações fisiológicas a ergotionina protegeria os espermatozóides contra efeitos deletérios sobre o metabolismo.

A remoção do plasma seminal antes do congelamento melhora a motilidade dos espermatozóides pós-descongelamento, pois a alta concentração de cloreto de sódio presente no líquido seminal pode causar

danos aos espermatozóides preservados “*in vitro*”. Contudo, o plasma seminal pode conter componentes que protegem as membranas durante a criopreservação, cuja composição pode variar entre gananhões. Tal fato pode explicar a habilidade diferente dos espermatozóides de gananhões, em sobreviver ao processo da criopreservação (Moore et al., 2005b). Por outro lado, a permanência de 10% de plasma seminal pós-centrifugação exerce um efeito benéfico sobre a motilidade espermática eqüina pós-descongelamento (Amann e Pickett, 1987; Jasko, 1992; Pickett e Amann, 1992; Brinsko et al., 2000). No entanto, o processo de centrifugação não é inócuo aos espermatozóides, podendo reduzir sua motilidade. Estudos recentes demonstraram que a centrifugação pode ser crítica para a membrana plasmática dos espermatozóides, devido à indução da peroxidação dos lipídios (Parinaud et al., 1997). Contudo, os efeitos deletérios desse procedimento podem ser minimizados com a utilização de força centrífuga reduzida, 300-400g e tempo adequado, 10 a 15 minutos (Amann e Pickett, 1987; Graham, 1996; Heitland et al., 1996).

Para o sêmen ser armazenado a baixas temperaturas é necessário que os espermatozóides sejam diluídos em diluidores especiais e apropriados (Amann

e Pickett, 1987; Holt, 2000). Os diluidores de sêmen possuem uma série de componentes básicos. Dentre esses, a água atua como solvente de outros componentes do meio; tampões e substâncias não iônicas atuam na manutenção da osmolaridade e pH do meio; macromoléculas da gema do ovo e/ou leite atuam na prevenção do choque térmico; carboidratos servem como fonte de energia e outras substâncias como antibióticos, que controlam o crescimento microbiano; detergentes que 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, limitando o movimento de íons bivalentes por meio da membrana, impedindo que os íons penetrem nas células espermáticas e as danifiquem durante o choque térmico e crioprotetores penetrantes ou intracelulares (Amann e Pickett, 1987).

A sobrevivência dos espermatozoides durante a criopreservação requer a presença de agentes crioprotetores nas etapas de resfriamento, congelamento e descongelamento. Várias substâncias são utilizadas como agentes crioprotetores a fim de manter a viabilidade das células animais, assim como polihidroxiálcoois, açúcares, cátions inorgânicos e aminoácidos. 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). Tem sido relatado que as propriedades requeridas para um eficiente efeito do crioprotetor são: baixo peso molecular, habilidade para atravessar as membranas das células vivas, alta solubilidade em soluções aquosas eletrolíticas e possuir baixa toxicidade (Alvarenga et al., 2005). Os crioprotetores são classificados como penetrantes ou intracelulares, constituídos de moléculas pequenas requerendo maior concentração, e não penetrantes ou extracelulares, constituídos de moléculas maiores requerendo uma menor concentração para que protejam as células contra as crioinjúrias (Pickett e Amann, 1992; Jasko, 1994; Graham, 1996). Em altas concentrações eles são tóxicos para as células espermáticas e resultam em baixas taxas de fertilidade (Graham, 1996; Watson, 2000). Parte dessa toxicidade é causada por alteração na composição bioquímica das membranas e estresse osmótico (Pickett e Amann, 1992). A maioria dos crioprotetores intracelulares atua como solvente e soluto, enquanto os extracelulares (proteínas, lipídios e açúcares) são solutos ou colóides e não atuam como solvente.

A característica mais importante de um crioprotetor é sua afinidade pela água. Dalimata e Graham (1997) afirmaram que os crioprotetores intracelulares possuem estruturas que promovem a ligação do hidrogênio com moléculas de água (propriedade coligativa) nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células. A sua capacidade de reduzir o ponto de congelamento das soluções é uma de suas propriedades coligativas, ponto em que ocorre a formação dos primeiros cristais de gelo (Dalimata e Graham, 1997). Muitas substâncias têm sido utilizadas como agentes crioprotetores intracelulares. Existem os crioprotetores do grupo dos álcoois: etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol, polietilenoglicol e propilenoglicol; as amidas, como a acetamida, formamida, lactamida e dimetil-sulfóxido, dentre outros (Holt, 2000).

O glicerol é o crioprotetor penetrante mais utilizado nos protocolos de congelamento (Holt, 2000), embora não apresente um efeito crioprotetor igualmente eficiente na criopreservação do sêmen de todas as espécies. Smith e Polge (1950) foram os primeiros pesquisadores a relatar o efeito crioprotetor do glicerol. A adição de glicerol ao meio de congelamento de sêmen induz a um aumento do volume de canais de solvente não congelados e uma menor

concentração de sais nestes canais (Mazur, 1984).

O efeito do glicerol na membrana plasmática pode ocorrer por meio de uma ligação direta aos fosfolipídios da membrana, reduzindo sua fluidez e interferindo na permeabilidade celular (Parks e Graham, 1992). Por outro lado, os efeitos deletérios do glicerol incluem estresse osmótico, mudanças na organização, fluidez e permeabilidade da membrana, e na sua composição lipídica (Watson, 1995).

O glicerol foi inicialmente utilizado na concentração de 7-10% (Smith e Polge, 1950). Segundo Amann e Pickett (1987), a concentração ideal do glicerol varia de 3 a 4%. Essas concentrações foram eficientes para preservar a motilidade do sêmen eqüino pós-descongelamento. No entanto, para minimizar os danos ao acrossoma, foram necessárias concentrações menores que 2% (Watson, 1995). Embora taxa de fertilidade similar com sêmen eqüino congelado utilizando-se concentrações de glicerol de 7% a 2% tenha sido reportada (Graham et al., 1978), foi demonstrado uma superioridade nas características 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 et al., 2005).

Outros crioprotetores penetrantes como o etilenoglicol (3,5%) e a acetamida (5%) associados a metilcelulose e trealose podem ser utilizados como crioprotetores alternativos para o congelamento de sêmen eqüino (Henry et al., 2002; Snoeck, 2003). Gomes et al. (2002) constataram que a associação de dimetilformamida com o glicerol apresentou melhores resultados quando comparada com o glicerol apenas. Os autores também afirmaram que a dimetilformamida é capaz de preservar a motilidade espermática similarmente a metilformamida e dimetilacetamida, a 3%; e que ambos tiveram atividade crioprotetora superior ao glicerol.

Os agentes crioprotetores extracelulares são grandes moléculas que não atravessam a membrana plasmática e podem ser proteínas como as presentes no leite e na gema do ovo, açúcares como a lactose, frutose, manose, rafinose e trealose, polímeros sintéticos como o polivinilpirrolidone e a metilcelulose (Jasko, 1994). Além dessas substâncias, a glicina betaína e a prolina atuam como potentes crioprotetores não penetrantes, interagindo diretamente com os lipídios e proteínas da membrana, mudando o

comportamento desses componentes durante a fase de transição e estado de hidratação da célula, durante o processo de congelamento (Holt, 2000). Os agentes crioprotetores não penetrantes atuam por meio de efeito osmótico, facilitando a desidratação celular, pois tornam o meio do diluidor seminal hipertônico. Com isso, a probabilidade de formação de cristais de gelo no interior das células, com conseqüente dano físico à membrana espermática, é reduzida (Amann e Pickett, 1987).

A gema de ovo, o mais eficiente dos agentes não penetrantes na proteção de espermatozoides contra o choque térmico, é comumente incluída em diluentes para criopreservação, mas não apresenta a mesma eficiência para o sêmen de todas as espécies. Quando presente em meios diluidores, a gema de ovo permite a redução da concentração de glicerol (Watson, 1995). Foi identificado o fator protetor ativo na gema de ovo, que é a fração lipoprotéica de baixa densidade (LDL) e alto peso molecular (Mayer e Lasley, 1945; Parks e Graham, 1992; Weitze e Petzoldt, 1992 e Watson, 1995). Essa fração lipoprotéica de baixa densidade é constituída de fosfolipídios e agiria somente na superfície celular, como um filme protetor. Os fosfolipídios que também estão abundantes

no leite produzem modificações estruturais nas membranas das células, permitindo, desse modo, a adaptação do espermatozóide a baixas temperaturas (Watson, 1985; Varner et al., 1988). Com a descoberta de que as proteínas do plasma seminal formam complexos estáveis com a LDL, um novo mecanismo de proteção espermática pela LDL tem sido proposto. As lipoproteínas de baixa densidade poderiam oferecer proteção ao espermatozóide, reduzindo os efeitos deletérios das proteínas do plasma seminal sobre a membrana plasmática. Leite ou diluidores a base de leite são usados na rotina para a diluição, centrifugação, resfriamento e armazenamento do sêmen equino. O fracionamento do leite pelos diferentes métodos (microfiltração, ultrafiltração ou diafiltração, ou congelamento seco) tem permitido a preparação das diferentes frações purificadas. Entre essas, o fosfocaseinato e a β -lactoglobulina foram as substâncias protetoras mais efetivas para preservar a motilidade durante o resfriamento e estocagem dos espermatozóides equinos (Batellier et al., 2001). No leite, os agentes crioprotetores seriam as micelas de caseínas que interagiriam com as proteínas do plasma seminal, impedindo o efluxo de fosfolipídios e colesterol da membrana plasmática do espermatozóide (Bergeron e Manjunath, 2006).

Pursel et al. (1978) verificaram que a adição de um detergente ao meio diluidor aumentou a proteção exercida pela gema de ovo aos espermatozóides. Foi sugerido, portanto, que a associação entre os componentes lipídicos da gema de ovo e a membrana celular resultava em modificação dos eventos da fase de transição e que a emulsificação aumentava essa atividade protetora (Watson, 1995).

Dalimata e Graham (1997) sugeriram que açúcares e moléculas de alto peso molecular e não penetrantes à membrana possam agir em conjunto com crioprotetores intracelulares, como a acetamida, e garantir proteção aos espermatozóides durante o congelamento e descongelamento. A glicose difere de outros açúcares usados na preparação de diluidores pelo fato de não ser ionizada e de ser utilizada pelo espermatozóide para produção de energia, aumentando a longevidade espermática (Bogart e Mayer, 1950).

A lactose parece estar envolvida na proteção espermática exercida pelo leite. Quando associada a diluidores compostos de caseínas, melhora a sua eficiência; entretanto, sozinha não é suficiente para proteger o espermatozóide (Bergeron e Manjunath, 2006).

2.6 Criocapacitação

Os compartimentos membranosos do espermatozóide são os que apresentam maior sensibilidade à redução brusca de temperatura. As membranas espermáticas afetadas pela criopreservação incluem as membranas plasmática, acrossômica externa e mitocondrial (Watson, 1995). A causa primária dos danos celulares causados pelo congelamento é a desestabilização da membrana plasmática devido ao estresse térmico, mecânico, químico e osmótico (Parks e Graham, 1992). As membranas respondem a alterações de temperatura através de transição da fase lipídica (Watson, 1995; Watson, 2000; Meyers et al., 2003). Com a redução de temperatura, os movimentos laterais dos fosfolipídios se tornam mais restritos, devido à mudança da fase fluida para gel, resultando em agrupamento de proteínas para as áreas fluidas remanescentes. Dessa forma, há uma tendência de certos fosfolipídios formarem a micela hexagonal II, que pode ser ou não reversível (Amann e Pickett, 1987; Parks e Graham, 1992; Watson, 1996). Modificações semelhantes na composição lipídica da membrana plasmática do espermatozóide são induzidas pelo bicarbonato presente no trato genital feminino, as quais foram observadas

durante o processo de resfriamento (Ashworth et al., 1994). O resfriamento do sêmen abaixo da temperatura de transição da fase lipídica pode desequilibrar sistemas enzimáticos, tais como ATPases, da membrana espermática de equinos (Watson, 1996; Meyers et al., 2003), touros e carneiros (Nauc, 1992).

Além do desequilíbrio físico da membrana, a taxa de regulação do volume osmótico e as respostas a fatores de estresse da célula espermática são altamente dependentes da permeabilidade celular à água, varia de acordo com a espécie, temperatura ambiente, tipos de crioprotetores e formação de cristais de gelo (Pommer et al., 2002; Meyers et al., 2003). Além disso, há evidências de que a permeabilidade da membrana plasmática seja diferente entre as regiões do espermatozóide (Watson, 2000; Meyers et al., 2003). Pommer et al. (2002) e Meyers et al. (2003) identificaram lesões sub-letais no sêmen eqüino, decorrentes de meio anisomótico. Embora a aparência das células estivesse normal à microscopia óptica, e o volume celular tenha retornado ao normal, houve redução significativa da motilidade espermática. Portanto, mudanças na pressão osmótica da fração descongelada, induzidas pela formação de cristais de gelo, podem aumentar a permeabilidade celular (Watson, 2000). Da

mesma forma, a permeabilidade celular pode ser modificada durante o resfriamento decorrente de alteração do envoltório lipídico, causada por crioprotetores intracelulares (Watson, 2000; Meyers et al., 2003). Durante o processo de criopreservação do sêmen de touros e carneiros, foi verificado aumento de permeabilidade e defeitos estruturais na membrana espermática (Nauc, 1992). Dessa maneira, foi sugerido que a sobrevivência das células espermáticas no trato reprodutivo feminino, assim como após a criopreservação, dependeria da qualidade do fluido do meio extracelular (Meyers et al., 2003). Além disso, a agregação de certos domínios da membrana poderia estar ligada a alterações nos sinais intracelulares (Watson, 1995; Watson, 2000) e parece estar envolvida com a capacitação espermática e resposta a estresses celulares (Meyers et al., 2003).

Foi demonstrado que, após o descongelamento do sêmen equino, os espermatozoides apresentam aumento na concentração de cálcio intracelular, indicando uma deficiência no controle desse íon (Watson, 2000; Meyers et al., 2003). Yanagimachi (1994) e Watson (2000) sugeriram que a desorganização da membrana decorrente do congelamento/descongelamento provoca

aumento da permeabilidade, e os íons cálcio presentes no meio extracelular penetrarão na célula, podendo estimular os eventos dependentes de cálcio, como a capacitação espermática. Para Watson (1995), o espermatozóide criopreservado pode ser considerado parcialmente capacitado, pois apresenta mudanças na fluidez da membrana. Sua sobrevivência é, portanto, limitada, pois o espermatozóide capacitado possui longevidade mais curta, e caso seu encontro com o oócito não ocorra, ele morrerá.

A fosforilação da tirosina de proteínas espermáticas é um importante mecanismo intracelular de regulação da função espermática e um significativo indicador de capacitação (Pommer e Meyers, 2002; Pommer et al., 2003). O desencadeamento da cascata de fosforilação e o aumento da concentração de cálcio intracelular podem ser induzidos por radicais livres e estresse osmótico devido a maior fragilidade da membrana (Pommer et al., 2003). Embora tenha sido demonstrado que uma consequência do processo de criopreservação seja a presença de altas taxas de fosforilação da tirosina na região da cauda do espermatozóide, tais taxas não foram superiores no sêmen congelado quando comparadas ao sêmen fresco (Bailey et al., 2000; Linfor et al., 2002;

Pommer e Meyers, 2002; Meyers et al., 2003). Bailey et al. (2000) verificaram que o aumento da fosforilação de tirosina no sêmen congelado de bovinos ocorreu imediatamente após o descongelamento. No entanto, no sêmen equino, tal aumento só foi observado após uma hora de incubação com ou sem ativadores da capacitação, sugerindo que os espermatozoides criopreservados podem ser mais sensíveis aos indutores da capacitação, o que poderia explicar seu tempo de vida limitado quando comparado ao do sêmen fresco (Pommer et al., 2003).

2.7 Reação Acrossômica Induzida

A capacitação espermática é um fenômeno que não está totalmente esclarecido. Apesar de várias técnicas de coloração terem sido utilizadas para identificar espermatozoides em diferentes estágios de capacitação (Saling e Storey, 1979; Cheng, 1996; Rath et al., 2001), os resultados são controversos. A técnica mais comumente utilizada para acessar a capacitação espermática é a indução da reação acrossômica (Landim-Alvarenga et al., 2004). No entanto, os métodos utilizados para este fim, são considerados não fisiológicos, já que eles ultrapassam os mecanismos normais de regulação intracelular, promovendo entrada de cálcio excessiva ou induzindo a um

aumento da capacidade de fusão da membrana (Gadella et al., 1995).

Embora a capacitação espermática ocorra no trato genital da fêmea, o desenvolvimento de sistemas “*in vitro*” de capacitação e fecundação, tornaram possível estudar mais detalhadamente os requerimentos específicos para a capacitação espermática e a habilidade fecundante de uma amostra de sêmen, podendo fornecer informações úteis no manejo reprodutivo (Landim-Alvarenga et al., 2004).

Espermatozoides podem sofrer reação acrossômica espontânea quando incubados em qualquer meio, em taxas muito baixas. As características ultra-estruturais das células espermáticas que sofreram reação acrossômica espontânea são semelhantes às das que foram induzidas quimicamente (Varner et al., 1987). A indução da reação acrossômica é calculada através da diferença entre a porcentagem total dos espermatozoides reagidos após a indução e a porcentagem de espermatozoides reagidos espontaneamente, sendo um indicador da função acrossomal (Zeginiadou et al., 2000).

A indução da reação acrossômica pode ser realizada utilizando-se vários agentes,

dentre eles o ionóforo de cálcio A23187, heparina, dilauroylphosphatidylcholine (PC12) e lysophosphatidylcholine (LPC) (Varner et al., 1987; Christensen et al., 1996; Landim-Alvarenga et al., 2004 e Gómez-Cuétara et al., 2006). A avaliação do acrossoma do espermatozóide eqüino é difícil, pois diferentes metodologias são empregadas para a indução e as comparações entre os estudos têm sido difíceis devido à utilização de sêmen fresco, ao invés do congelado, e este é o mais utilizado nos procedimentos de fertilização *in vitro* (Gómez-Cuétara et al., 2006).

O ionóforo de cálcio A23187 tem sido largamente utilizado para induzir artificialmente a reação acrossômica em diversas espécies de mamíferos como camundongos, humanos, gatos, suínos e eqüinos (Tanphaichitr e Hansen, 1994; Francavilla et al., 1995; Long et al., 1996; Visconti et al., 1999 e Varner et al., 2002). O espermatozóide eqüino, nos estudos de fertilização "*in vitro*", tem apresentado resposta melhor a indução com ionóforo de cálcio quando comparado a outros indutores da capacitação espermática (Magistrini et al., 1997). Visconti et al. (1999), estudando a indução da reação acrossômica com o ionóforo de cálcio A23187 em sêmen de camundongos, observaram que este agente pode induzir a exocitose do acrossoma de

maneira não regulada, independente de prévia capacitação.

O ionóforo de cálcio é um íon móvel carreador que forma um complexo lipofílico com o cálcio e facilita seu transporte através da membrana plasmática do espermatozóide (Talbot et al., 1976). Assim o ionóforo de cálcio A23187 induz a exocitose do acrossoma em meio contendo cálcio como conseqüência do aumento da concentração de cálcio intracelular, requisito para que ocorra a fusão das membranas associada com a reação acrossômica. Apesar de não ser um processo fisiológico, sugere-se que o desafio com ionóforo tenha valor na previsão da fertilidade (Januskauskas et al., 2000).

2.8 Funções do colesterol na criopreservação celular

Os diferentes compartimentos da membrana plasmática apresentam composições e propriedades físicas distintas. Assim sendo, a distribuição do colesterol entre as membranas da célula espermática não é uniforme. A razão colesterol:fosfolipídios na membrana plasmática de espermatozóides eqüinos é cerca de 0,36 (Darin-Bennett e White, 1977; Parks e Lynch, 1992 e Cross, 1998). O colesterol

também não está distribuído uniformemente nas faces interna e externa da membrana plasmática (Yeagle, 1985). Espermatozoides bovinos, ovinos e de cobaias apresentam a região apical da membrana plasmática com aproximadamente quatro vezes mais colesterol do que a região pós-acrossomal (Holth e North 1984).

O colesterol é capaz de intercambiar entre as membranas e dois mecanismos poderiam explicar a manutenção da sua distribuição. O primeiro seria devido a um equilíbrio termodinâmico (Lange et al., 2004), no qual a composição da membrana, como o conteúdo lipídico e a natureza das proteínas, determinaria a quantidade relativa de colesterol. O outro mecanismo seria o fluxo de colesterol entre o local de síntese (fígado, intestino, córtex da adrenal e gônadas) e a membrana plasmática (Yeagle, 1985).

O colesterol apresenta uma importante função na estabilização das membranas. A remoção do colesterol da membrana plasmática promove a sua desestabilização e, conseqüentemente a reorganização dos componentes da bicamada, incluindo redistribuição de proteínas integrais (Amann e Graham, 1992; Gadella et al., 2001; Gadella e Colenbrander, 2003),

aumentando sua capacidade de fusão (Cross, 1998). Um dos primeiros estudos realizados sobre os efeitos do colesterol demonstrou que este causa o desaparecimento da fase de transição da esfingomielina, que é um dos principais fosfolipídios da membrana plasmática, e cria um estado fluido intermediário da membrana, fazendo com que os lipídios permaneçam num estado líquido-cristalino ao invés de gel (Go e Wolf, 1983; Yeagle, 1985). Além de ajudar a mantê-los num arranjo aleatório, o colesterol apresenta um pequeno efeito sobre a difusão lateral dos fosfolipídios, o qual se torna pronunciado quando as membranas são submetidas a temperaturas inferior a da fase de transição dos fosfolipídios, aumentando a taxa de difusão. Em condições como estas, observa-se efeito do colesterol sobre a difusão lateral de certas proteínas (Davis, 1980; Yeagle, 1985; Delpech e Thibault, 1993; Gadella et al., 2001). Estudos físico-químicos feitos em modelos de membranas sugerem que o colesterol é importante na formação de uma estrutura razoavelmente impermeável e coesa, particularmente na presença de grandes quantidades de ácidos graxos insaturados (Darin-Bennett e White, 1977; White, 1993). Essa redução na permeabilidade da membrana é mais pronunciada em relação à permeabilidade aos cátions e ainda influencia a mobilidade

dos componentes e a atividade de enzimas ligadas à membrana (Go e Wolf, 1983; Yeagle, 1985). Outro modelo sob investigação é que a perda de colesterol leva a um aumento do pH intracelular, que é um pré-requisito para que o espermatozóide sofra capacitação espermática. Em ratos, a capacidade de o espermatozóide sofrer a reação acrossômica está associada com elevações do pH intracelular (Working e Meizel, 1983). Foi observado que bactérias que possuíam baixo teor de colesterol nas membranas apresentavam pequena tolerância a baixas temperaturas (Rottem et al., 1973 citados por White, 1993). A partir desse fato, a quantidade de colesterol nas membranas dos espermatozóides foi relacionada com sua susceptibilidade ao choque térmico (White, 1993).

A concentração de colesterol na membrana plasmática varia consideravelmente entre as espécies. Acredita-se que a maior parte do colesterol do espermatozóide seja proveniente do ambiente, entretanto pouco se conhece sobre a dinâmica dos esteróides nas membranas espermáticas. Em algumas espécies a concentração de colesterol na membrana plasmática do espermatozóide muda através do trânsito epididimário. O espermatozóide eqüino tem seu conteúdo de colesterol reduzido durante a passagem pelo epidídimo (Lopez e Souza, 1991; Cross,

1998). Este fato pode ser o responsável pelo aumento da susceptibilidade a danos na manipulação “*in vitro*” da célula espermática (White, 1993). Darin-Bennett e White (1977) examinaram o conteúdo de colesterol de espermatozóides de coelhos, humanos, bovinos e ovinos e sua correlação com a susceptibilidade ao choque térmico. Os espermatozóides das espécies que se mostraram mais susceptíveis ao choque térmico apresentaram taxas molares colesterol:fosfolipídios menores que os espermatozóides das espécies mais resistentes. O espermatozóide da espécie suína possui a menor proporção colesterol:fosfolipídios - 0,26 - e é a que apresenta maior susceptibilidade ao choque térmico (Darin-Bennett e White, 1977; Parks e Lynch, 1992). Por outro lado, a concentração de colesterol na membrana plasmática de espermatozóides humanos demonstrou não ser um marcador representativo da resistência espermática ao congelamento (Meseguer et al., 2004).

Visto que a maior proporção de colesterol:fosfolipídio na membrana plasmática promove maior estabilidade da mesma, foi sugerido que a inclusão de colesterol ou de lipossomas contendo colesterol no meio diluidor do sêmen poderia aumentar a viabilidade e a longevidade dos espermatozóides (White,

1993; Cross, 1998). Embora o colesterol promova menor fluidez da bicamada lipídica, em altas concentrações impede a aproximação das cadeias de hidrocarbonetos e sua cristalização. Dessa forma, o colesterol inibe possíveis transições de fase (Alberts et al., 2004), as quais estão associadas a mudanças na permeabilidade e na capacidade de fusão da membrana (Holth e North, 1986).

Os resultados relativos à indução de proteção aos espermatozoides contra o choque térmico têm sido muito variados. Holt e North (1986) foram capazes de alterar o comportamento da fase de transição de membranas plasmáticas de espermatozoides de ovinos, elevando o ponto de transição através do uso de lipossomas de colesterol. Uma alteração como esta, segundo Drobnis et al. (1993), deveria diminuir a lesão de membrana durante a criopreservação. Graham e Foote (1987) e Butler e Roberts (1993) utilizaram lipossomas de colesterol e fosfatidilserina e relataram aumento de motilidade pós-descongelamento em sêmen de touros e varrões, respectivamente. Em outro estudo, entretanto, Holt e North (1988) não encontraram vantagem na adição de lipossomas contendo colesterol em sêmen de ovino.

Resultados conflitantes foram relatados com o tratamento de sêmen de garanhões com lipossomas de colesterol. Heitland et al. (1995) relataram aumento na motilidade, porém nenhum efeito sobre a fertilidade do sêmen resfriado, ao passo que, quando os lipossomas foram adicionados antes do congelamento, observou-se aumento de fertilidade, sem aumento da motilidade. Outros estudos não confirmaram estes resultados, relatando que o uso de lipossomas não melhorou a fertilidade do sêmen descongelado de garanhões (Wilhelm et al., 1996; Denniston et al., 1997).

Outra maneira de incorporar o colesterol na membrana plasmática dos espermatozoides é através do complexo de inclusão com ciclodextrinas. As ciclodextrinas podem ser consideradas moléculas anfífilas e têm a capacidade de desempenhar vários tipos de interações moleculares e a habilidade de formar diversas espécies de complexos supramoleculares com interessantes propriedades físico-químicas e diversas aplicações científicas e tecnológicas, como encapsulamento molecular, liberação sustentada de fármacos, solubilização de materiais insolúveis em água, emulsificação, catálise, etc (Hall, 2004). As ciclodextrinas podem admitir várias substâncias em sua cavidade sem a

formação de ligações covalentes (Saenger, 1980; Challa et al., 2005).

O ramo da química dedicado ao estudo dos arranjos moleculares e das ligações não covalentes é denominado Química Supramolecular. Esta ciência tem como objetivo caracterizar, tentar prever e atribuir funcionalidade aos agregados das moléculas (Hall, 2004).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, produtos da degradação do amido, compostos por unidades glicosídicas que adotam uma conformação em cadeira

(Figuras 7 e 8). São capazes de formar complexos de inclusão com diversas moléculas que aparentemente precisam satisfazer apenas uma condição – devem se encaixar inteira ou parcialmente na cavidade da ciclodextrina (Challa et al., 2005). O método utilizado para a síntese dos complexos depende das propriedades dos componentes das substâncias que são complexadas. Substâncias hidrossolúveis são dissolvidas diretamente em soluções aquosas e substâncias insolúveis em água devem ser dissolvidas em éter, clorofórmio, benzeno ou outro solvente orgânico (Saenger, 1980).

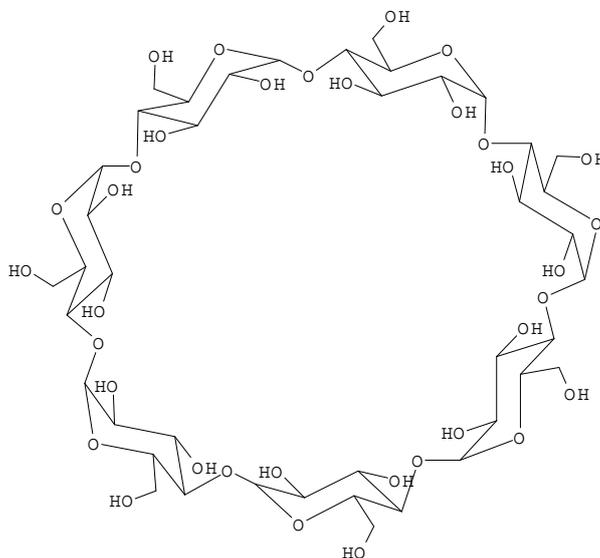


Figura 7. Fórmula estrutural de uma ciclodextrina (βCD) (Challa et al., 2005).

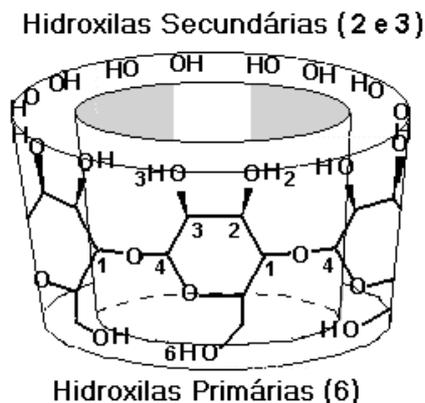


Figura 8. Estrutura da ciclodextrina na forma de um cone truncado (Challa et al., 2005)

Os tipos mais comuns de ciclodextrinas produzidas possuem 6, 7 ou 8 unidades glicosídicas, designadas α , β e γ ciclodextrinas, respectivamente (Saenger, 1980). As β -ciclodextrinas apresentam uma estrutura adequada para englobar moléculas naturais e sintéticas como hormônios, vitaminas e componentes lipídicos (Challa et al., 2005). Além disso, são compostos com uma cavidade hidrofóbica capaz de dissolver compostos hidrofóbicos, aumentando sua solubilidade em soluções aquosas. “*In vitro*”, β -ciclodextrinas têm alta afinidade por esteróides quando comparado a outros lipídios e, devido à relativamente alta especificidade pelo colesterol, tem sido sugerido que estes compostos podem ser efetivos na modificação do metabolismo do colesterol “*in vivo*” (Yancey et al., 1996).

Existem também ciclodextrinas modificadas, sintetizadas a partir da α , β e γ ciclodextrinas, através da substituição dos grupos hidroxilas por grupos hidroxipropila, metila e sulfobutila. Essas modificações melhoram sua solubilidade e habilidade de dissolver esteróides em solução aquosa e também reduzem sua toxicidade (Challa et al., 2005).

Existem trabalhos que demonstram a espontaneidade dos processos de complexação das ciclodextrinas com diversas espécies químicas, formando entidades comumente conhecidas como compostos de inclusão. A formação dos compostos de inclusão é regida por vários tipos de interações intermoleculares e sabe-se que as moléculas de água desempenham um papel fundamental no fenômeno de complexação. Em decorrência do fato de as

moléculas de água presentes na cavidade das ciclodextrinas estarem em um estado de alta energia e baixa entropia, na presença de um terceiro componente, cuja polaridade seja menor do que da água, ocorre a formação de complexos supramoleculares, através da entrada de moléculas ou grupos funcionais de moléculas em sua cavidade, com subsequente exclusão das moléculas de água ali presentes (Saenger, 1980).

A 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e a metil- β -ciclodextrina constituem um método simples e efetivo para monitorar o fluxo de colesterol entre as reservas celulares e a membrana plasmática de células (Kilsdonk et al., 1995; Neufeld et al., 1996; Kritharides et al., 1996; Christian et al., 1997). O uso de ciclodextrinas para a incorporação de colesterol em membranas plasmáticas foi relatado primeiramente por Klein et al. (1995). Estes autores utilizaram metil- β -ciclodextrina para manipular o conteúdo de colesterol de membranas plasmáticas de células miométriais.

A habilidade da metil- β -ciclodextrina e seu complexo de inclusão com colesterol em alterar o conteúdo desse esteróide da membrana plasmática é devida à formação de uma nova reserva contendo colesterol na fase aquosa. Esta reserva é rapidamente envolvida num equilíbrio entre o colesterol

ligado à membrana e o colesterol complexado com a ciclodextrina. A incubação da membrana plasmática com a ciclodextrina isoladamente provoca a retirada do colesterol, com o equilíbrio voltado para o lado do complexo de inclusão (Atger et al., 1997). Inversamente, a incubação da membrana plasmática desprovida de colesterol com o complexo de inclusão leva à restauração do colesterol da membrana (Klein et al., 1995). Yancey et al. (1996) demonstraram que as ciclodextrinas são mais eficientes em retirar o colesterol da membrana plasmática, quando comparadas à lipoproteína de alta densidade (HDL), devido ao seu menor tamanho e, portanto, maior facilidade de acesso à membrana plasmática e por ser possível a transferência direta do colesterol para a cavidade hidrofóbica das ciclodextrinas.

Alguns estudos demonstraram que o conteúdo elevado de colesterol pode ser prejudicial ao espermatozóide (Parks et al., 1981) e contribuir para a infertilidade do sêmen de humanos e garanhões (Sugkraroek et al., 1991; Brinsko et al., 2005), por induzir um estado de decapacitação, inibindo a reação acrossômica (Davis, 1978). Há evidências anteriores de que a capacidade fecundante do espermatozóide é influenciada pelos

níveis de colesterol na membrana plasmática da célula espermática e que a fusão da membrana é inibida pelo colesterol (Davis e Hungrund em 1976; Davis, 1980). Estudando espermatozóides humanos, Giraud et al. (2000) verificaram que o aumento exacerbado nas proporções colesterol:fosfolipídios resulta em uma redução significativa da fluidez da membrana plasmática em temperatura fisiológica, o que é prejudicial para a sobrevivência espermática pós-descongelamento.

Torres et al. (2006) verificaram uma melhora significativa tanto na motilidade quanto na integridade de membrana quando incorporaram colesterol na membrana espermática, estudando sêmen equino resfriado. Estudos recentes com sêmen congelado caprino, bovino, suíno, ovino e eqüídeos, além de demonstrarem melhora nos parâmetros de motilidade (Barrera-Compean et al., 2005) e viabilidade espermáticas (Combes et al., 2000; Mocé e Graham, 2006; Galantino-Hommer et al., 2006), encontraram taxas de fertilidade similares tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*”, quando comparados os diluidores com e sem colesterol (Purdy e Graham, 2004a; Purdy e Graham, 2004b; Morrier et al.; Álvarez et al. 2006 e Moore et al. 2005a). Os autores também observaram aumento de

células espermáticas viáveis com acrossoma intacto e maior número de espermatozóides ligados à zona pelúcida, comprovando o potencial fecundante dos espermatozóides acrescidos de colesterol. No entanto, Zahn et al. (2002), com sêmen congelado equino, demonstraram taxas de fertilidade inferiores quando comparadas à inseminação artificial com o diluidor sem acréscimo de colesterol. Foi sugerido, portanto, que a inclusão de colesterol ao meio diluidor tenha inibido a reação acrossômica devido a um aumento na rigidez da membrana plasmática e, conseqüentemente, reduzido as taxas de fertilidade (Zahn et al., 2002).

A incubação de espermatozóides de ratos, bovinos, bodes, suínos e humanos com a metil- β -ciclodextrina, como receptor de colesterol, demonstrou que a remoção desse esteróide pode desencadear a capacitação e a reação acrossômica, provavelmente restaurando o potencial fecundante dos espermatozóides congelados após a incorporação de colesterol em suas membranas (Choi e Toyoda, 1998; Cross, 1999; Visconti et al., 1999; Iborra et al., 2000; Funahashi, 2002; Galantino-Hommer et al., 2006).

2.9 Avaliação Espermática

A avaliação do sêmen é fundamental para a predição do desempenho reprodutivo do garanhão e possui dois principais objetivos: prever a fertilidade potencial de um determinado animal e avaliar com mais acurácia se o sêmen de um garanhão é capaz de ser submetido a procedimentos como o resfriamento e o congelamento (Magistrini, 2000). Com o objetivo de correlacionar os resultados de avaliações laboratoriais com aqueles dos testes de fertilidade, muitos estudos têm investigado as diversas características seminais. Historicamente, a avaliação da qualidade seminal tem tido como base a análise da motilidade espermática e das características morfológicas e a determinação do número de espermatozoides. A motilidade é a característica mais frequentemente avaliada, embora sua correlação com a fertilidade seja controversa. A análise computadorizada da motilidade (computer assisted semen analysis - CASA) vem ganhando popularidade devido a sua objetividade, porém é utilizada principalmente em pesquisas por causa do alto custo do equipamento. Embora seja fácil a criação de uma grande quantidade de dados usando o CASA (Rathi et al., 2001), ainda não está bem claro quais das características de motilidade mensuradas

são de importância fisiológica (Katila, 2001). O espermatozoide necessita da motilidade para a penetração na junção útero-tubárica, liberação dos sítios de armazenamento espermático na tuba uterina e penetração através de células que circundam o ovócito (Amann, 1989; Magistrini, 2000; Neild, 2005). A motilidade espermática pode estar comprometida se as mitocôndrias estiverem afunccionais, se a membrana plasmática estiver lesada, se o espermatozoide tiver sofrido choque térmico ou se estiver morfológicamente anormal (Kirk, 2001; Neild, 2005).

Outras características seminais como porcentagem de espermatozoides viáveis, com membrana plasmática e acrossômica íntegra têm apresentado correlação positiva significativa com a fertilidade (Januskauskas et al., 2000; García-Macias et al., 2006).

A avaliação da funcionalidade da membrana é realizada pelo teste hiposmótico (HOST). Quando os espermatozoides são submetidos às soluções hiposmóticas, aqueles com membrana funcional sofrem abaulamento na região da cauda, demonstrando que a membrana plasmática está mais frouxamente aderida. Enquanto o

espermatozóide conseguir equilibrar a entrada e a saída de fluidos intracelular é sinal de que a membrana plasmática está funcionalmente intacta. Quando o espermatozóide não mais suportar o estresse osmótico, a membrana plasmática se rompe e ocorre desespiralização da cauda (Jeyendran et al., 1984).

O teste hiposmótico foi desenvolvido para a avaliação do sêmen de humanos, utilizando-se uma solução a 150 mOsm/L contendo citrato de sódio e lactose (Jeyendran et al., 1984). A avaliação da funcionalidade da membrana plasmática do espermatozóide 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. (1998) para a avaliação do sêmen equino. Nesta avaliação, uma alíquota de 100µL de sêmen é adicionada a 200µL de (diluição 1:2) de água destilada, ambos a 37°C, seguido de incubação em banho-maria a 37°C por cinco minutos. 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 do percentual existente anteriormente a exposição do espermatozóide ao meio hiposmótico.

Diversos métodos foram desenvolvidos para avaliar a integridade física da membrana plasmática e do acrossoma de espermatozoides em preparações coradas. A integridade da membrana plasmática pode ser considerada um indicador indireto de viabilidade espermática (Magistrini et al., 1997). A coloração com os corantes eosina-nigrosina e sondas fluorescentes como diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), o iodeto de propídio (IP) e o Hoechst 33258 são alguns dos métodos utilizados para detectar a integridade de membrana celular (Garner et al., 1986 e Harrison e Vickers, 1990; Smith e Murray, 1997). O maior benefício da utilização de sondas fluorescentes é o maior contraste, a menor variabilidade e maior especificidade quando comparadas às colorações clássicas (Neild, 2005). Garner et al. (1986) utilizaram a combinação de duas substâncias fluorescentes, o CFDA e o IP, para verificar a integridade física da membrana de espermatozoides bovinos e de outras espécies com citometria de fluxo. A mesma técnica foi modificada para avaliação em microscopia de fluorescência por meio da utilização de baixas concentrações de formaldeído para paralisação dos

espermatozóides (Harrison e Vickers, 1990).

O iodeto de propídio é um corante não permeante à membrana plasmática, penetrando apenas através de membranas danificadas se ligando e corando o seu DNA. Dessa forma, o IP em solução salina quantifica as células mortas, promovendo fluorescência vermelho-brilhante (Jones e Senft, 1985; Harrison e Vickers, 1990).

O diacetato de carboxifluoresceína é um composto hidrofóbico capaz de penetrar a membrana celular sem interferência fisiológica. No interior da célula o diacetato de carboxifluoresceína é hidrolisado por uma interação enzimática e é convertido num composto hidrofílico fluorescente – carboxifluoresceína, não penetrante à membrana plasmática, acumulando-se no interior da célula e tornando os compartimentos com membrana íntegra verde fluorescente quando excitados com luz azul (Jones e Senft, 1985; Harrison e Vickers, 1990; Garner e Johnson, 1995).

O congelamento do sêmen afeta a integridade do acrossoma. Portanto, os danos causados às células espermáticas podem ser monitorados através da avaliação do status acrossômico (Cross e Hanks, 1991). Vários métodos de avaliação

acrossômica podem ser utilizados, como microscopia de contraste de fase, microscopia eletrônica, microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (Zeginiadou et al., 2000; Neild, 2005).

A microscopia de contraste de fase pode ser utilizada para avaliar o estatus acrossômico em espécies que apresentam um acrossoma grande, porém o acrossoma do espermatozóide eqüino é pequeno, dificultando sua avaliação por esse método (Talbot e Chacon, 1981; Cross e Meizel, 1989). Em contrapartida, a microscopia eletrônica, embora seja um dos mais eficazes métodos para detectar alterações acrossômicas, é um método de alto custo, laborioso e de difícil utilização na rotina da maioria dos laboratórios (Zeginiadou et al., 2000).

Com o advento das técnicas de fluorescência, novos ensaios foram desenvolvidos para avaliar o status do acrossoma. A morfologia do acrossoma pode ser avaliada ligando os espermatozóides a lectinas (Neild, 2005), glicoproteínas encontradas tanto em plantas como em animais, que apresentam uma habilidade única de ligação a carboidratos específicos. A utilização de lectinas como sondas histoquímicas tem fornecido ferramentas úteis para o estudo de

alterações de carboidratos associadas à progressão neoplásica, de eventos bioquímicos na divisão celular e embriogênese, e da arquitetura e alterações das membranas celulares (Cooper, 1984; Cox et al., 1998). O acrossoma é uma estrutura rica em carboidratos, aos quais as lectinas se ligam (Jones et al., 1988). O isotiocianato de fluoresceína (FITC) é a sonda fluorescente que tem sido conjugada a lectinas para avaliar o status acrossômico de espermatozoides de várias espécies (Cross e Meizel, 1989; Kirk, 2001).

As lectinas mais comumente utilizadas são a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) ou a aglutinina de *Arachis hypogaea* (PNA). A coloração com FITC-PNA tem sido utilizada com sucesso em espermatozoides de humanos, macacos, suínos, caprinos (Cross e Meizel, 1989) e eqüinos (Casey et al., 1993). O monitoramento do status acrossômico utilizando PSA foi confirmado por microscopia eletrônica (Casey et al., 1993 e Meyers et al., 1995), no entanto, possui a desvantagem de se ligar em resíduos de açúcar da zona pelúcida (Skutelsy et al., 1994).

A aglutinina do amendoim (PNA), isolada de sementes de *Arachis hypogaea*, é uma lectina vegetal não glicosilada composta de quatro subunidades idênticas de 27 kDa. As

lectinas de leguminosas, uma das famílias de proteínas vegetais mais estudadas, mostram uma ampla abrangência em suas especificidades por carboidratos. O reconhecimento específico de carboidratos pelas lectinas é crítico para as interações celulares e, por isso, tem implicações em diversas áreas da biologia e da medicina (Kumar et al., 1999). O PNA é oriundo do amendoim, se liga a galactose, presente na membrana acrossômica externa, não se ligando a membrana plasmática (Zeginiadou et al., 2000; Cheng, 1996).

A coloração com FITC-PNA é utilizada em preparações que realizam a prévia permeabilização da membrana plasmática através do uso de substâncias como metanol ou etanol. Dessa forma, a sonda tem acesso a toda superfície da membrana acrossômica e apresenta fluorescência em todas as células não reagidas, visto que não existe a barreira da membrana plasmática. Diversos padrões de fluorescência representam a fusão parcial da membrana plasmática com a membrana acrossômica externa, característica de células que estão sofrendo a reação acrossômica. A completa fusão da membrana plasmática com a membrana acrossômica externa indica o fim do processo de reação acrossômica e resulta na perda da membrana acrossômica e, conseqüentemente, não haverá

fluorescência do espermatozóide (Cheng , 1996; Blottner, 1998).

A coloração com FITC-PNA também pode ser utilizada sem a permeabilização da membrana plasmática, tornando fluorescente a região acrossômica das células que estão sofrendo reação acrossômica. Uma vez que esta sonda conjugada não é penetrante a membrana plasmática, esta, somente será capaz de se ligar à membrana acrossômica externa naquelas células em que houve a formação de poros na membrana plasmática (Kirk, 2001; Rathi et al., 2001).

Por meio de colorações que avaliem a integridade física da membrana plasmática e do acrossoma, é possível identificar espermatozoides com membrana plasmática íntegra que realmente tenham sofrido reação acrossômica (reação acrossômica verdadeira) daqueles que tiveram seu acrossoma destacado como consequência de morte celular (reação acrossômica falsa) e diferenciá-los (Cheng, 1996; Cox et al., 1998; Smith e Murray, 1997; Rathi et al., 2001; Casey et al., 1993).

O status acrossômico com a coloração FITC-PNA pode ser avaliado com a citometria de fluxo (Graham et al., 1990; Merkies et al., 2000). Esta técnica permite

detectar várias características espermáticas simultaneamente em milhares de espermatozoides em um curto período de tempo (Arruda et al., 1986; Zeginiadou et al., 2000; Rathi et al., 2001). Além do mais, aumenta a objetividade das mensurações quando comparada à contagem das células marcadas individualmente através de microscopia, apesar de não haver muitos estudos disponíveis correlacionando as duas técnicas. Devido ao alto custo da técnica, a citometria de fluxo ainda está limitada à utilização em pesquisas (Graham et al., 1990; Merkies et al., 2000; Neild, 2005).

Graham et al. (1990), Andrade et al. (2007) e Celeghini et al. (2007) estabeleceram uma correlação entre ensaios padrões de laboratório e com citometria de fluxo para avaliação da viabilidade celular, integridade acrossomal e funcionalidade mitocondrial de espermatozoides bovinos. A correlação não foi perfeita provavelmente devido ao número de células analisadas em cada técnica, 200 e 10.000 para microscopia e citometria de fluxo, respectivamente. A única desvantagem da citometria de fluxo é que os espermatozoides são classificados quanto ao status acrossômico em apenas duas categorias, reagidos ou intactos. Os estágios intermediários não podem ser diferenciados como na microscopia de

fluorescência (Rathi et al., 2001; García-Macías et al., 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do sêmen

Foi utilizado um ejaculado de doze garanhões, com idade variando entre quatro e doze anos, localizados na Região Metropolitana de Belo Horizonte – MG. Os animais foram selecionados de acordo com exames andrológicos. Para estabilização da produção espermática diária dos garanhões, quando necessário, foram realizadas coletas de sêmen diárias por sete dias consecutivos. O sêmen foi coletado através de vagina artificial modelo “Hannover” e imediatamente após a coleta, o sêmen foi filtrado para a retirada da fração gel e avaliado quanto a motilidade total e progressiva, vigor, concentração e morfologia espermáticas.

3.2 Avaliação espermática do sêmen fresco

Os dados de motilidade total (porcentagem de células móveis), progressiva (células com movimento retilíneo ou movimento circular aberto) e o vigor (observação da velocidade do movimento dos espermatozóides) foram computados, com

auxílio de um microscópio de campo claro (100x). Somente foram congelados ejaculados que apresentaram motilidade espermática progressiva igual ou superior a 50% e vigor igual ou superior a 2. Para se calcular a concentração espermática foi utilizada uma câmara hemocitométrica. A morfologia espermática de 100 espermatozóides por ejaculado foi avaliada através do método de preparação úmida (Mies Filho, 1975) com solução de formolsalina em microscopia de contraste de fase (1000x). Só foram congelados ejaculados com porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais maior ou igual a 70%.

3.3 Avaliação microbiológica dos meios diluidores

Os meios diluidores de centrifugação e congelamento foram submetidos ao ensaio microbiológico. Para a realização do ensaio foi utilizado o meio BHI (Brain Heart Infusion), 37g/L H₂O destilada e os meios foram avaliados após 48 horas de cultivo em condições de anaerobiose e aerobiose. Nas condições de anaerobiose e aerobiose, o meio de centrifugação Kenney apresentou 2 e nenhuma ufc (unidade formadora de colônia) e o meio de congelamento INRA 82, 58 e 32 ufc, respectivamente.

3.4 Congelamento do sêmen

Os ejaculados foram divididos em três amostras, de acordo com os tratamentos (Figura 9). Tratamento 1 (congelamento convencional): após a diluição 1:1 com diluidor Kenney (Anexo 1), a alíquota de sêmen seguiu no processo de criopreservação. Tratamento 2, em que foi realizada a diluição do sêmen no diluidor Tyrode modificado (TALP) (Anexo 1) de modo a se obter uma concentração de 120×10^6 espermatozoides/ml e foi adicionado 1,5 mg do complexo metil- β -ciclodextrina-colesterol (M β CD-col) para cada 120×10^6 espermatozoides. Essa alíquota foi submetida a incubação por 15 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, diluída no meio Kenney (1:1). A terceira alíquota foi destinada para o controle do tratamento 2 (TALP C-2), sendo diluída no meio TALP, submetida a incubação nas mesmas condições que o tratamento 2, porém sem a adição do complexo de inclusão M β CD-col, sendo igualmente diluída no meio Kenney.

A preparação do complexo de M β CD-colesterol foi realizada como descrito por Purdy e Graham (2004b). Em um tubo, 1g de M β CD¹ foi dissolvido em 2ml de metanol. Em um segundo tubo, 200mg de colesterol² foram dissolvidos em 1ml de

clorofórmio e uma alíquota de 450 μ l dessa solução foi adicionada à solução de M β CD. A solução combinada de M β CD-col foi misturada vigorosamente até que se obtivesse uma solução clara. Os solventes foram removidos por “speed-vac”, utilizando o equipamento Univapo 100H³ e os cristais resultantes foram armazenados em temperatura ambiente até a sua utilização. Para incorporação do colesterol aos espermatozoides, foi utilizada uma solução trabalho de M β CD-colesterol adicionando-se 50mg do complexo M β CD-colesterol a 1ml de meio Tyrode modificado (TALP), e incubada a 37°C em banho-maria até a sua utilização.

Após diluição no meio Kenney todas as alíquotas foram centrifugadas (500g por 10 min), o sobrenadante foi retirado e deixado aproximadamente 10% do volume total do sêmen. O sedimento foi homogeneizado por agitação e ressuspensionado com diluidor de congelamento, INRA 82 (Anexo 1) de forma a se obter 100×10^6 espermatozoides/mL.

O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL e resfriado a + 5°C (0,53 °C/min), em 50 minutos. As palhetas contendo o sêmen resfriado foram expostas a 3 cm de altura do nível de nitrogênio líquido por vinte minutos, seguidas de imersão no mesmo.

¹ Methyl- β -cyclodextrin, C 4555, Sigma

² Cholesterol, C 8503, Sigma

³ Uniequip ®

Para verificar se a retirada do colesterol das membranas espermáticas aumentaria a capacidade dos espermatozoides de sofrer reação acrossômica induzida após o descongelamento do sêmen, duas concentrações de metil- β -ciclodextrina foram testadas para a remoção do colesterol nos tratamentos 3 e 4. No tratamento 3, a concentração ([M β CD 1x]) foi a mesma utilizada para incorporar o colesterol nas membranas, 0,052mg para cada 50×10^6 espermatozoides, e no tratamento 4 a concentração foi três vezes maior ([M β CD 3x]), 0,156mg para cada 50×10^6 espermatozoides, com o objetivo de impedir a ligação da metil- β -ciclodextrina aos lipídios do diluidor de congelamento utilizado.

De uma solução trabalho contendo 5 mg de metil- β -ciclodextrina adicionada a 1 mL de TALP para diluir os componentes lipídicos do diluidor, foram retiradas alíquotas de 10,4 μ L e 31,2 μ L para as concentrações [M β CD 1x] e [M β CD 3x] respectivamente, e adicionadas ao sêmen descongelado contendo 50×10^6 espermatozoides. As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e após o período de incubação, o sêmen foi avaliado quanto ao status do acrossoma antes e após a reação acrossômica induzida.

O descongelamento do sêmen foi realizado a temperatura de 75 °C por 7 segundos (Cochran et al. 1984; Arruda et al., 1986) e mantido a 37°C por 30 segundos, quando foi avaliado quanto à motilidade total e progressiva, vigor, morfologia espermática (microscópio óptico), integridade funcional (teste hiposmótico) e física (iodeto de propídeo) da membrana plasmática, porcentagem de espermatozoides capacitados e reagidos antes e após a indução da reação acrossômica (citometria de fluxo).

3.5 Avaliação espermática pós-descongelamento

As avaliações de motilidade total e progressiva, vigor e morfologia espermática foram realizadas como descrito anteriormente para o sêmen fresco. A motilidade progressiva foi avaliada a cada passo do processo de criopreservação com o objetivo de verificar a influência do diluidor utilizado em cada etapa e a eficiência do método/procedimento utilizado para o congelamento do sêmen. A porcentagem de espermatozoides com funcionalidade de membrana íntegra foi avaliada através do teste hiposmótico com água destilada (Lomeo e Giambersio, 1991) modificado por Lagares et al. (1998) na diluição 1:2

(sêmen:água destilada). Uma alíquota de 100 µL de sêmen foi adicionada a 200 µL de água destilada, ambos a 37°C, seguido de incubação em banho-maria a 37°C por

cinco minutos. Após este período, as amostras foram analisadas em microscopia de contraste de fase (400x).

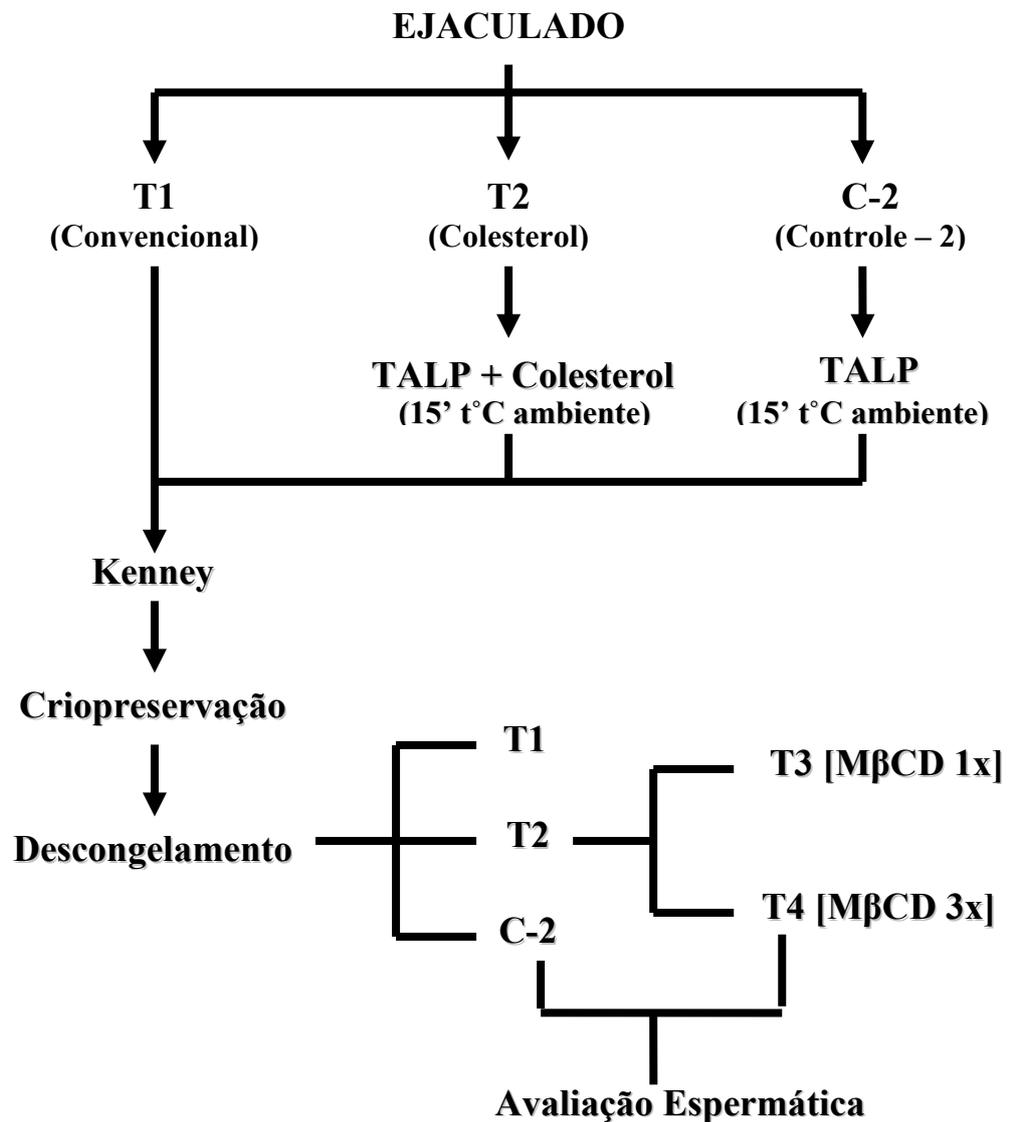


Figura 9. Esquema representativo do experimento.

Foram avaliadas 100 células por amostra e calculado o percentual de espermatozóides que reagiram positivamente ao teste hiposmótico com cauda enrolada. A avaliação da morfologia dos espermatozóides pós-descongelamento foi realizada através de preparação úmida e a porcentagem de espermatozóides com cauda enrolada foi computado. Esses foram subtraídos do percentual de espermatozóides que reagiram ao teste hiposmótico.

As avaliações de integridade de membrana plasmática e acrossoma dos espermatozóides foram realizadas utilizando-se as colorações Iodeto de Propídeo (IP) e FITC-PNA. As amostras de sêmen descongeladas foram diluídas 1:20 em PBS (250 µL de sêmen:5 mL de PBS) . Uma alíquota de 200 µL dessa suspensão foi diluída novamente acrescentando-se 1 mL de PBS. Após a diluição, foram coradas com FITC -PNA⁴ (1,125 g/mL) e incubadas por 10 minutos em banho-maria a 37°C. Em seguida foram coradas com IP⁵ (1,5 mM) e incubadas por mais 10 minutos em temperatura ambiente (Anexo 2). Logo, as amostras foram submetidas a leitura no citômetro de fluxo (FACScalibur⁶). Dez mil eventos, a uma taxa de 500 células por segundo, foram analisados por amostra.

Os dados correspondentes à fluorescência vermelha (IP - FL3 fotodetector) e verde (FITC-PNA - FL1 Fotodetector) das partículas foram contabilizados. Os espermatozóides que fluoresceram de vermelho foram classificados como não viáveis e os que fluoresceram de verde, os que sofreram a reação acrossômica.

3.6 Indução da Reação Acrossômica (RAI)

Para avaliar a capacidade fecundante “*in vitro*” do espermatozóide equino pós-descongelamento, foi realizado a indução da reação acrossômica (RAI), com ionóforo de cálcio A23187⁷, no sêmen de todos os tratamentos.

Após diluir o ionóforo de cálcio em DMSO (Dimetilsulfóxido) (0,5 mg/mL), foi adicionado 5µL dessa solução a uma alíquota de 0,5mL da amostra de sêmen descongelado (50×10^6 espermatozóides), sendo a concentração final de 9,5µM (Anexo 3). Após o período de 30 minutos de incubação, as amostras foram reavaliadas quanto ao estatus do acrossoma por meio de citometria de fluxo como descrito anteriormente.

⁴ Conjugado de Lectina de *Arachis Hypogaea* L 7381, Sigma

⁵ PI, P 4170, Sigma

⁶ Becton Dickinson®

⁷ Cálcio ionóforo A23187, Alomone Labs

3.7 Análises Estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, considerando o garanhão como bloco. Os cálculos de média, desvio padrão e análise de variância foram realizados conforme Sampaio (2002).

Posteriormente, as médias obtidas para os diferentes parâmetros (motilidade total e progressiva, vigor, integridade funcional da membrana, viabilidade espermática, integridade estrutural do acrossoma dos espermatozoides) foram comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK).

Os dados que não apresentaram distribuição normal e homocedasticidade foram transformados em arco-seno da raiz quadrada.

Para a comparação da taxa de reação acrossômica, dos espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossoma lesado, antes e depois da indução da reação acrossômica foi utilizado o teste t de student pareado. O nível de significância dos testes realizados foi de 95% ($p < 0,05$).

Na análise estatística foi utilizado o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características de avaliação do sêmen fresco dos ejaculados dos doze garanhões utilizados no experimento estão descritos na Tabela 1.

A motilidade total do sêmen fresco variou de 50 a 85%, a motilidade progressiva de 50 a 80%, enquanto que o vigor espermático foi observado de 2 a 4 entre os garanhões avaliados, estando dentro do valor mínimo necessário para avaliação quanto a sua congelabilidade. A concentração espermática/mL apresentou uma variação de 60 a 570 x 10⁶ espermatozoides, enquanto o número total de espermatozoides no ejaculado variou de 3,2 x 10⁹ a 11,5 x 10⁹. O número de espermatozoides morfológicamente normais no ejaculado (76 a 93%) apresentou-se dentro da normalidade para o sêmen fresco equino.

Tabela 1. Características de avaliação do sêmen fresco (n=12).

GARANHÃO	MT (%)	MP (%)	VIGOR (1-5)	CONC. ESP./mL (x 10 ⁶)	VOLUME (mL)	NTE (x 10 ⁹)	MORF. NORMAIS (%)
1	60	55	3	280	15	4,2	88
2	70	65	4	165	42	6,9	92
3	65	60	3	60	100	6,0	85
4	85	80	3-4	115	100	11,5	82
5	70	65	3	95	90	8,5	76
6	60	55	3	155	41	6,3	84
7	50	50	2-3	145	22	3,2	91
8	70	60	3	175	40	7,0	80
9	70	60	3	70	70	4,9	77
10	70	60	3	570	9	5,1	81
11	70	60	3	295	27	7,9	93
12	75	70	3-4	60	190	11,4	93

MT: motilidade total; **MP:** motilidade progressiva; **CONC. ESP./mL:** concentração espermática/mL; **MORF. NORMAIS:** porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais; **NTE:** número total de espermatozóides no ejaculado.

Na Tabela 2 estão demonstrados os valores percentuais médios e o desvio-padrão da motilidade progressiva espermática em cada etapa do processo de congelamento. Embora a motilidade progressiva espermática tenha sido inferior após a incubação do sêmen no meio TALP (TALP C-2, controle do tratamento 2), comparado ao tratamento no qual houve adição do complexo metil- β -ciclodextrina-colesterol, M β CD-colesterol (TALP + COL – tratamento 2), não foi observada diferença quanto a motilidade progressiva após a diluição e ressuspensão com os diluidores Kenney e INRA 82. Quando da ressuspensão com o meio INRA 82, as motilidades progressivas foram semelhantes em todos os tratamentos. É provável que este fato se deva a ausência de lipídios,

como substrato energético na composição do meio TALP, o qual foi suprido pela ressuspensão com o diluidor INRA 82, bem como a incorporação do colesterol da gema de ovo deste diluidor pelos espermatozóides. No entanto, pós-descongelamento, foi observada redução significativa ($p < 0,05$) da porcentagem de espermatozóides móveis no tratamento TALP C-2, comparado ao adicionado de colesterol (tratamento 2) e ao convencional (tratamento 1). Portanto, a adição do colesterol no meio diluidor TALP preservou a motilidade progressiva espermática do sêmen equino, sendo semelhante ao congelamento convencional e superior as amostras diluídas no meio TALP, indicando o efeito protetor do colesterol.

Tabela 2. Motilidade progressiva durante as etapas do processo de congelamento, nos diferentes tratamentos (média \pm desvio-padrão).

Tratamento	Motilidade Progressiva (%)				
	Pós-diluição TALP	Pós- incubação (15 min)	Pós- diluição Kenney	Pós-diluição INRA 82	Pós-Descongelamento
1) Convencional	----	----	66,3 \pm 7,7 ^a	62,9 \pm 5,4 ^a	20,4 \pm 13,7 ^a
2) TALP + COL	60,0 \pm 7,7	60,0 \pm 8,3 ^a	62,5 \pm 7,8 ^b	63,8 \pm 7,1 ^a	20,0 \pm 10,0 ^a
TALP (C-2)	60,0 \pm 7,7	55,8 \pm 10,6 ^b	60,4 \pm 8,1 ^b	59,6 \pm 9,6 ^a	9,2 \pm 4,7 ^b

Tratamento (1): Diluição Kenney (1:1) + centrifugação + ressuspensão INRA 82; **(2)** Diluição TALP + M β CD-col (15') + tratamento (1); **Talp (C-2):** Controle do tratamento 2, diluição TALP (15') + tratamento (1). **M β CD-col:** complexo metil- β -ciclodextrina-colesterol; **COL:** colesterol. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

O percentual de espermatozoides com motilidade progressiva, vigor, viabilidade espermática e membrana plasmática funcional após o descongelamento estão demonstrados na Tabela 3. Visto que o tratamento TALP C-2 apresentou motilidade progressiva espermática muito baixa, optou-se por não se avaliar os outros parâmetros seminais.

No presente experimento, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras incubadas em diluente sem colesterol e aquelas incubadas em diluente contendo colesterol no parâmetro motilidade progressiva pós-descongelamento, sugerindo que o possível efeito protetor do colesterol, que promove maior estabilidade de membrana, não tem influência sobre a motilidade progressiva dos espermatozoides. Esses resultados foram semelhantes aos relatados em trabalhos com sêmen congelado de equino

(Zahn et al., 2002; Moore et al., 2005a) e bovino (Mocé e Graham, 2006). Contudo, outros estudos com sêmen congelado de eqüídeos (Combes et al., 2000; Álvarez et al., 2006) e bovinos (Purdy e Graham, 2004a, b) verificaram um aumento na motilidade pós-descongelamento quando foi realizada a incorporação do colesterol com a metil- β -ciclodextrina. Quando foi incorporado colesterol com ciclodextrina (Kirk, 2001 e Torres et al., 2006) e lipossomas (Heitland et al., 1995) no sêmen refrigerado equino, foi observado aumento da motilidade espermática até 72h a + 5°C, comparado às amostras sem colesterol. No entanto, quando adicionado o colesterol por meio de lipossomas no sêmen congelado equino (Heitland et al. 1995), essa melhora não foi observada pós-descongelamento, ao contrário do verificado no sêmen congelado bovino (Graham e Foote, 1987). No presente experimento, foi utilizada a mesma técnica de incorporação do colesterol ao

espermatozóide eqüino descrita para bovinos (Purdy e Graham, 2004 a, b) e eqüinos (Moore et al., 2005a). A variação dos resultados desses estudos pode ser decorrente da diferença de tamanho, forma, composição lipídica (Parks e Lynch, 1992; Parks et al., 1981) e permeabilidade de membrana dos espermatozóides eqüino e bovino (Guthrie et al., 2002).

O efeito do colesterol sobre a motilidade espermática ainda é controverso, já que relatos de literatura são conflitantes. Além disso, comparações diretas entre os vários estudos se tornam difíceis, visto que diversos procedimentos são utilizados para a incorporação do colesterol na membrana plasmática do espermatozóide, vários meios são utilizados, diferentes métodos de criopreservação são realizados com espermatozóides de diferentes espécies.

Tabela 3. Médias (\pm DP) da motilidade progressiva, vigor e membranas plasmáticas íntegras (citometria de fluxo e HOST) de espermatozóides criopreservados.

Tratamento	MP (%)	VIGOR (1-5)	IP – (%)	HOST + (%)
1	20,4 \pm 13,7 ^a	2,3 \pm 1,0 ^b	23,2 \pm 9,3 ^b	26,3 \pm 13,1 ^a
2	20,0 \pm 10,0 ^a	2,6 \pm 0,5 ^a	32,9 \pm 10,3 ^a	29,1 \pm 12,2 ^a
3	21,3 \pm 8,3 ^a	2,8 \pm 0,4 ^a	26,3 \pm 12,7 ^b	24,8 \pm 8,3 ^a
4	23,8 \pm 9,1 ^a	2,8 \pm 0,5 ^a	23,4 \pm 10,3 ^b	24,8 \pm 6,2 ^a

Tratamento (1): Diluição Kenney (1:1) + centrifugação + ressuspensão INRA 82; **(2):** Diluição TALP + M β CD-col (15') + tratamento 1; **(3):** tratamento 2 + [M β CD 1x] pós-descongelamento; **(4):** tratamento 2 + [M β CD 3x] pós-descongelamento. **M β CD-col:** complexo metil- β -ciclodextrina-colesterol. **MP:** motilidade progressiva; **IP-:** espermatozóides viáveis avaliados com a coloração Iodeto de Propídeo; **HOST +:** espermatozóides com membrana plasmática funcional, positivos ao teste hiposmótico. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

O vigor espermático foi superior ($p < 0,05$) nos tratamentos que receberam o colesterol (tratamentos 2, 3 e 4), comparado ao tratamento 1. Foi provado que o colesterol é incorporado em todas as membranas, se localizando em maior concentração nas membranas acrossômicas e mitocondriais (Moore et al., 2005a). Embora Zahn et al. (2002), trabalhando com sêmen congelado eqüino não tenha observado diferença de vigor entre os tratamentos que receberam

colesterol e o controle, no presente experimento, é possível que a incorporação do colesterol na membrana mitocondrial tenha beneficiado a produção de energia dos espermatozóides móveis.

A adição de colesterol através do complexo com M β CD-colesterol ao sêmen fresco resultou em maior porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra pós-descongelamento, comparado

aos tratamentos 1, 3 e 4, quando avaliados com a coloração vital Iodeto de Propídeo (IP) (Tabela 3). O colesterol é incorporado por todos os espermatozóides e em todas as membranas celulares (Moore et al., 2005a). Portanto, no presente trabalho, a incorporação de colesterol às membranas espermáticas foi suficiente para proteger o espermatozóide contra os efeitos deletérios do congelamento sobre a integridade física da membrana plasmática (Amann e Pickett, 1987). Estudos com sêmen congelado bovino (Purdy e Graham, 2004a, b; Mocé e Graham, 2006) e equino (Combes et al., 2000; Zahn et al., 2002; Moore et al., 2005a) e sêmen resfriado suíno (Galantino-Hommer et al., 2006) verificaram aumento similar da porcentagem de espermatozóides viáveis quando o colesterol foi incorporado nas membranas. Ao contrário, quando foi adicionado lipossomas contendo colesterol e fosfatidilserina em diferentes meios diluidores, não houve efeito sobre a porcentagem de células espermáticas com membrana plasmática íntegra após o descongelamento do sêmen equino (Wilhelm et al., 1996).

Um estudo sobre a função do colesterol nas membranas celulares sugeriu que o rápido movimento do colesterol através da membrana poderia auxiliar nas alterações morfológicas as quais as células são

submetidas. Dessa forma, a quantidade relativa de material de cada lado da membrana plasmática sofre pequenas mudanças para acomodar um desbalanço de volume. O rápido movimento do colesterol pela membrana poderia satisfazer as modificações de volume necessárias, mantendo a integridade da membrana plasmática (Yeagle, 1985).

O exato mecanismo de proteção das membranas espermáticas exercido pelo colesterol não está esclarecido. Espécies com alta proporção de colesterol:fosfolípidios (coelhos e humanos) são mais resistentes ao choque térmico. Pelo menos parte dos prejuízos espermáticos induzidos pelo choque térmico é devido à fase de transição dos lípidios, a qual a membrana espermática é submetida durante o processo de congelamento. Nos espermatozóides humanos uma fase de transição lipídica não é detectada quando são resfriados (Drobnis et al., 1993). Alta concentração de colesterol estabiliza as membranas durante o resfriamento. O conteúdo de colesterol nas membranas espermáticas de bovinos e equinos aumentou de 2 a 3 vezes comparado ao tratamento controle após a adição do complexo M β CD-colesterol (Purdy e Graham, 2004b; Moore et al., 2005a) e permaneceu maior após o

descongelamento, impedindo que as células espermáticas sofressem capacitação espermática prematura (Moore et al., 2005a). Os autores relataram um aumento da proporção colesterol:fosfolípidios no sêmen bovino de 0,45 (Darin-Bennett e White, 1977) para 0,9 (Purdy e Graham, 2004b), e no eqüino de 0,36 (Darin-Bennett e White, 1977; Parks e Lynch, 1992 e Cross, 1998) para 0,89 (Moore et al., 2005a) tornando os valores similares àqueles de espermatozoides de coelho (0,88) e do homem (0,99) (Watson, 1981). Foi sugerido que a fase de transição dos lípidios tenha sido eliminada ou a temperatura na qual ela ocorre seja menor para sêmen bovino e eqüino tratado com colesterol comparado ao controle. Com as duas concentrações de metil- β -ciclodextrina utilizadas no presente trabalho, foi observada uma redução de viabilidade comparada ao tratamento 2 (Tabela 3). Há relatos de efeitos deletérios da metil- β -ciclodextrina sobre a viabilidade espermática (Visconti et al., 1999). Estudos *in vitro* demonstraram que a exposição de fibroblastos a ciclodextrinas pode causar toxicidade celular (Kilsdonk et al., 1995). Não existem trabalhos na literatura que tenham retirado o colesterol da membrana plasmática de espermatozoides após sua incorporação através da complexação com a M β CD. A técnica utilizada para retirar o

colesterol foi à mesma utilizada para incorporá-lo na membrana plasmática espermática antes do congelamento. Devido a composição do meio diluidor de congelamento (INRA82), rica em lípidios, a concentração de M β CD utilizada para incorporar o colesterol poderia não ser suficiente. Portanto, foi testada uma concentração três vezes superior a essa. Foi destacado por Purdy e Graham (2004a, b) que um aspecto muito importante quando se utiliza o complexo M β CD-colesterol para incorporar o colesterol na membrana plasmática, é que o complexo deve ser incubado com o espermatozoide diluído num meio desprovido de lípidios. Estudos desses autores (não publicados) indicaram que o complexo adicionado ao sêmen previamente diluído em um meio contendo gema de ovo, não beneficia a sobrevivência da célula espermática pós-descongelamento, pois a maioria dos lípidios da solução seria proveniente da gema do ovo e não do espermatozoide. A maior parte do colesterol complexado com a M β CD seria transferida preferencialmente para as gotas lipídicas da gema de ovo ao invés das membranas do espermatozoide. Combes et al. (2000) observaram que os espermatozoides incubados no meio TALP juntamente com o complexo M β CD-colesterol incorporaram maior quantidade de colesterol em suas membranas, devido a

indisponibilidade de colesterol adicional nesse diluidor, comparada ao meio Kenney modificado. Por outro lado, o efeito da inclusão de colesterol foi o mesmo em todos os diluentes utilizados por Zahn et al. (2002), inclusive naquele em que havia gema de ovo, sem haver interação entre o tratamento com colesterol e os diluentes (Zahn et al., 2002).

A porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática funcional, avaliada por meio do teste hiposmótico (HOST), foi semelhante em todos os tratamentos. O colesterol poderia diminuir os danos osmóticos, visto que o tratamento com o complexo M β CD-colesterol aumentaria a tolerância osmótica do espermatozoide eqüino (Moore et al., 2005b). Tal fato é muito importante uma vez que o espermatozoide é submetido a grandes mudanças de volume quando os crioprotetores são adicionados ou removidos, e as membranas espermáticas podem ser prejudicadas durante esses processos (Graham, 1996). Ao contrário do observado no presente experimento, com sêmen resfriado eqüino (Torres et al., 2006) e congelado de jumento (Álvarez et al., 2006), foi observada maior porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática funcional nos tratamentos nos quais o

colesterol foi adicionado. Embora no presente trabalho tenha sido realizado o congelamento do sêmen eqüino e Torres et al. (2006) o tenham resfriado, é possível que a maior concentração de M β CD-colesterol (2,5 mg/120 x 10⁶ de espermatozoides) utilizada por estes autores tenha promovido uma maior proteção a funcionalidade da membrana plasmática do espermatozoide eqüino, em comparação à utilizada no presente experimento (1,5 mg/120 x 10⁶ de espermatozoides). Por outro lado, quando o sêmen de jumento foi congelado, parece que a concentração de 1,5 mg/120 x 10⁶ de espermatozoides foi suficiente para aumentar a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática funcional, comparada ao controle (Álvarez et al., 2006).

Visto que em alguns trabalhos (Visconti et al., 1999; Kirk, 2001; Gadella e Harrison, 2002; Leschner, 2006) foi proposto uma ação tóxica do ionóforo de cálcio A23187 sobre a viabilidade do espermatozoide durante a indução da reação acrossômica (RAI), no presente experimento foi avaliada com a coloração vital IP a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra pós-descongelamento e pós-RAI com o ionóforo de cálcio A23187 (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática íntegra pós-descongelamento e pós-RAI (média \pm desvio-padrão).

Tratamento	Espermatozoides com membrana plasmática íntegra IP - (%)	
	Pós-descongelamento	Pós-RAI
1	23,2 \pm 9,3 ^{ba}	20,7 \pm 8,1 ^{aA}
2	32,9 \pm 10,3 ^{aA}	28,7 \pm 11,4 ^{aB}
3	26,3 \pm 12,7 ^{ba}	26,4 \pm 12,7 ^{aA}
4	23,4 \pm 10,3 ^{ba}	21,6 \pm 10,5 ^{aA}

Tratamento (1): Diluição Kenney (1:1) + centrifugação + ressuspensão INRA 82; **(2):** Diluição TALP + M β CD-col (15') + tratamento 1; **(3):** tratamento 2 + [M β CD 1x] pós-descongelamento; **(4):** tratamento 2 + [M β CD 3x] pós-descongelamento. **M β CD-col:** complexo metil- β -ciclodextrina-colesterol. **RAI:** reação acrossômica induzida. **IP:** iodeto de propídeo. **a, b:** letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). **A, B:** letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).

Conforme já descrito anteriormente, a maior porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra pós-descongelamento foi observada no tratamento 2, no qual as amostras foram incubadas no diluente contendo colesterol. No entanto, após a indução da reação acrossômica, houve redução do percentual de células espermáticas com membrana plasmática íntegra, suportando a hipótese de que o tratamento com ionóforo de cálcio pode ter induzido a morte celular. Contudo, nos tratamentos 1 e nos quais houve a retirada do colesterol (tratamentos 3 e 4), não foi observada redução do número de espermatozoides com membrana plasmática íntegra após a RAI.

Em células somáticas e no espermatozoide, a enzima cálcio-ATPase, localizada na membrana plasmática, é importante para a manutenção da concentração de cálcio intracelular, através do bombeamento desse íon para o meio extracelular (Schatzmann,

1985). A toxicidade do cálcio foi explicada por Landim-Alvarenga et al. (2004) que sugeriu que uma excessiva entrada de cálcio no interior do espermatozoide impediria a manutenção da concentração normal de cálcio intracelular, e esse aumento poderia induzir alterações semelhantes às do processo de capacitação espermática, conseqüentemente, diminuindo a sua longevidade. Por algum mecanismo não conhecido, a maior concentração de colesterol no tratamento 2 pode ter favorecido este fato. Além disso, é possível que o colesterol tenha interagido com o cálcio e outros componentes do diluidor de congelamento, alterando a concentração de solutos na fração de água não congelada durante a criopreservação, reduzindo a viabilidade espermática (Watson, 1981).

Na Tabela 5, está apresentada a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossoma íntegros, com acrossoma lesado pós-

descongelamento e após a indução da reação acrossômica com ionóforo de cálcio A23187, avaliada com as colorações IP e FITC-PNA, respectivamente, nos diferentes tratamentos.

O ionóforo de cálcio A23187 pode induzir a reação do acrossoma mesmo em

espermatozoides que não foram capacitados (Visconti et al., 1999). Essa substância, utilizada para induzir a reação do acrossoma em muitas espécies de mamíferos, induziu com sucesso a reação acrossômica em espermatozoides eqüinos (Varner et al., 1987).

Tabela 5. Porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossoma íntegro, com acrossoma lesado pós-descongelamento e com acrossoma lesado pós-RAI com o ionóforo de cálcio A23187, do número total de espermatozoides (média \pm desvio-padrão).

Tratamento	Pós-descongelamento		Pós-RAI
	Espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossoma intacto	Espermatozoides com membrana plasmática íntegra e com acrossoma lesado	Espermatozoides com membrana plasmática íntegra e com acrossoma lesado
1	22,2 \pm 9,2 ^b	1,0 \pm 1,1 ^{aA}	3,5 \pm 3,2 ^{aB}
2	31,9 \pm 10,1 ^a	0,9 \pm 0,6 ^{aA}	2,5 \pm 1,8 ^{aB}
3	25,5 \pm 12,8 ^b	0,8 \pm 0,7 ^{aA}	3,0 \pm 2,5 ^{aB}
4	22,6 \pm 10,3 ^b	0,7 \pm 0,5 ^{aA}	2,5 \pm 2,6 ^{aB}

Tratamento (1): Diluição Kenney (1:1) + centrifugação + ressuspensão INRA 82; **(2):** Diluição TALP + M β CD-col (15') + tratamento 1; **(3):** tratamento 2 + [M β CD 1x] pós-descongelamento; **(4):** tratamento 2 + [M β CD 3x] pós-descongelamento. **M β CD-col:** complexo metil- β -ciclodextrina-colesterol. **RAI:** reação acrossômica induzida; **RA:** reação acrossômica. **a, b:** letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). **A, B:** letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).

A figura 10 mostra a quantidade de fluorescência emitida pelas células espermáticas. O quadrante superior esquerdo demonstra os espermatozoides emitindo fluorescência vermelha, com membrana plasmática lesada e acrossoma intacto; o quadrante inferior esquerdo representa os espermatozoides que não emitiram fluorescência, ou seja, possuíam membrana plasmática íntegra e acrossoma intacto; já o quadrante superior direito mostra as células que emitiram fluorescência vermelha e verde, isto é, com

membrana plasmática e acrossoma lesados; por fim, o quadrante inferior direito representa os espermatozoides que somente emitiram fluorescência verde, demonstrando os espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossoma lesado.

A maior porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossoma intacto pós-descongelamento avaliados com a coloração IP e FITC-PNA, respectivamente, através da citometria de

fluxo foi observada no tratamento 2. Com a possível remoção do colesterol (tratamentos 3 e 4), verificou-se que os espermatozoides apresentaram porcentagens semelhantes às do tratamento 1 (sem adição de colesterol) e inferior ao tratamento 2, sugerindo um efeito tóxico da ciclodextrina, como discutido anteriormente.

Quando foram avaliadas as porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática

íntegra e acrossoma lesado pós-descongelamento e após a indução da reação acrossômica entre a população total de espermatozoides, não houve diferença entre os tratamentos, contrariando os relatos de que o colesterol reduziria a reação acrossômica (Cross, 1996; Davis, 1980; Zahn et al., 2002) (Tabela 5).

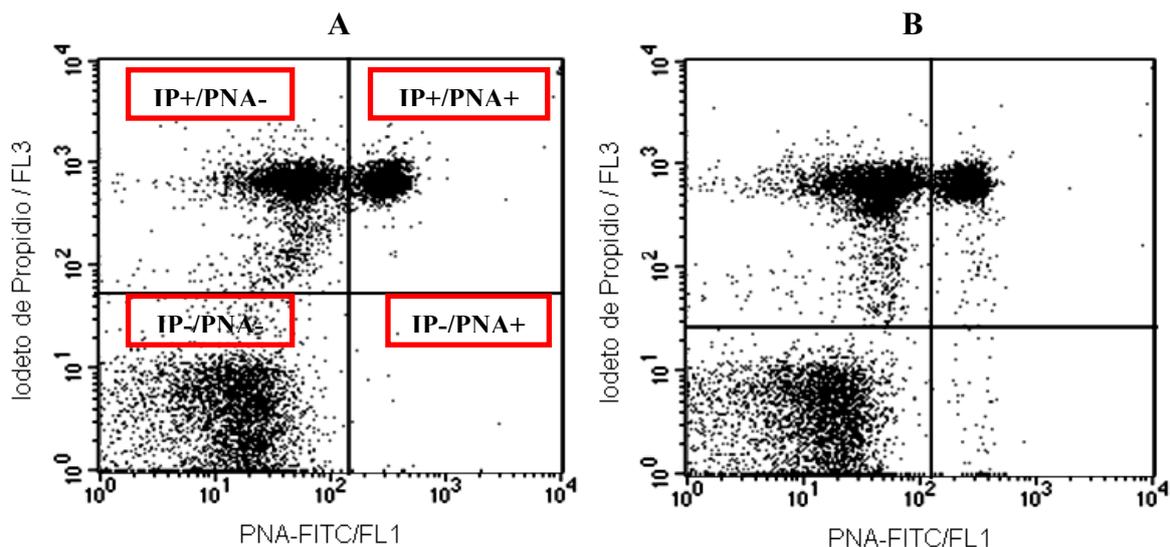


Figura 10. Quantidade de fluorescência emitida pela sonda FITC-PNA detectada pelo fotodetector FL-1 está indicada no eixo X, enquanto a quantidade de fluorescência emitida pela coloração vital IP e detectada pelo fotodetector FL-3 está indicada no eixo Y. **(A)** Pós-descongelamento e **(B)** Pós-RAI.

Estes resultados confirmam os observados no espermatozoide bovino pós-descongelamento, embora no sêmen fresco

o colesterol tenha reduzido a porcentagem de reação acrossômica (Purdy e Graham, 2004a). Zahn et al. (2002) avaliaram a

porcentagem de espermatozoides que sofreram a reação acrossômica após a indução com o ionóforo de cálcio A23187 depois do descongelamento do sêmen eqüino, contabilizando os espermatozoides viáveis e mortos que haviam reagido. Visto que a verdadeira reação acrossômica ocorre apenas nos espermatozoides vivos (Didion et al., 1989), no presente estudo somente estes foram considerados reagidos. Conseqüentemente, a taxa de reação acrossômica foi inferior à relatada naquele trabalho.

Taxas superiores de reação acrossômica foram relatadas com sêmen fresco eqüino e com tempos de incubação superiores ao utilizado no presente experimento (30 min x 1 a 3h) (Varner et al., 1987; Christensen et al., 1996; Varner et al., 2002). É relatado que há grande variação nas taxas de reação acrossômica induzida com o ionóforo de cálcio A23187 entre os ganhões, resultando em alto desvio-padrão para as médias (Landim-Alvarenga et al., 2004). Entretanto, quando a avaliação da taxa de reação acrossômica foi calculada sobre a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, esta sofreu

uma redução significativa no tratamento 2 após a indução da reação acrossômica (Tabela 6). O colesterol pode ter interferido no processo de reação acrossômica induzida pelo tratamento com ionóforo de cálcio A23187. Possivelmente, o colesterol tornou a membrana plasmática mais estável, dificultando a entrada do cálcio, levando a uma redução da taxa de reação acrossômica no tratamento 2. Essa estabilidade da membrana plasmática poderia explicar a menor fertilidade do grupo de éguas inseminadas com sêmen congelado adicionado de colesterol (25%) comparado ao grupo de éguas inseminadas com sêmen congelado convencionalmente (75%), descrito por Zahn et al. (2002). Entretanto, em bovinos não foi observada diferença quanto à taxa de fertilidade *in vivo* e *in vitro* quando houve adição de colesterol ao sêmen, comparado ao controle (Purdy e Graham, 2004a). Outros trabalhos relataram que o colesterol reduz a taxa de reação acrossômica espontânea (Cross, 1996; Davis, 1980), o que não foi observado no presente experimento.

Tabela 6. Porcentagens de espermatozoides com acrossoma lesado do número de espermatozoides com membrana plasmática íntegra pós-descongelamento e pós-RAI (média ± desvio-padrão).

Tratamento	Taxa de espermatozoides com acrossoma lesado / espermatozoides com membrana plasmática íntegra (%)	
	Pós-descongelamento	Pós-RAI
1	4,3 ± 4,9 ^{aA}	16,5 ± 11,0 ^{aB}
2	3,2 ± 1,9 ^{aA}	9,3 ± 5,9 ^{bB}
3	4,7 ± 6,7 ^{aA}	11,3 ± 7,1 ^{abB}
4	4,2 ± 4,7 ^{aA}	11,8 ± 9,9 ^{abB}

Tratamento (1): Diluição Kenney (1:1) + centrifugação + ressuspensão INRA 82; **(2):** Diluição TALP + MβCD-col (15') + tratamento 1; **(3):** tratamento 2 + [MβCD 1x] pós-descongelamento; **(4):** tratamento 2 + [MβCD 3x] pós-descongelamento. **MβCD-col:** complexo metil-β-ciclodextrina-colesterol. **RAI:** reação acrossômica induzida. **RA:** reação acrossômica **a, b:** letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). **A, B:** letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).

Em humanos (Sugkroek et al., 1991) e equinos (Brinsko et al., 2007), foi sugerido que alta proporção de colesterol:fosfolípidios na membrana plasmática dos espermatozoides poderiam contribuir para a infertilidade. A razão colesterol:fosfolípidios nas células espermáticas de pacientes com infertilidade idiopática é aproximadamente o dobro daquela encontrada em doadores férteis (Sugkroek et al., 1991). Espermatozoides de homens normospermicos e de garanhões subférteis não foram capazes de fecundar oócitos *in vitro* e de sofrer reação acrossômica induzida pelo ionóforo de cálcio A23187, respectivamente. Estes apresentavam um conteúdo anormalmente alto de colesterol ou uma perda excessivamente lenta (Benoff et al., 1993; Brinsko et al., 2007). A remoção do colesterol é fundamental para a capacitação e embora a função do colesterol no processo de capacitação espermática *in vivo*

não esteja totalmente compreendida, ela está fortemente relacionada à capacitação *in vitro* (Visconti et al., 1999).

O colesterol causa uma diminuição seletiva na permeabilidade da membrana plasmática aos cátions (Yeagle, 1985), concordando com a sugestão de que a remoção do colesterol da membrana plasmática dos espermatozoides poderia aumentar a permeabilidade do espermatozoide a certos íons como o cálcio, que é capaz de estimular a adenilciclase espermática (Visconti et al., 1999). Uma vez retirado o colesterol inserido antes do congelamento, uma possível indução da capacitação espermática e de reação acrossômica poderia se iniciar.

Possivelmente, as duas concentrações de MβCD utilizadas para a remoção do colesterol da membrana plasmática dos espermatozoides, tenham sido suficientes

para que a porcentagem de espermatozoides que reagiram a indução da reação acrossômica com o ionóforo de cálcio A23187 não diferissem do tratamento 1 (Tabela 6). Por outro lado, não foi o suficiente para diferir do tratamento 2, em que não houve a remoção do colesterol pós-descongelamento.

Foi sugerido que dificilmente se estabelecerá um protocolo capaz de retirar apenas a quantidade adicional de colesterol, restaurando as concentrações fisiológicas (Zahn et al., 2002). No entanto, em trabalho realizado com células miometriais, foi possível retirar o colesterol das membranas plasmáticas e, posteriormente, adicioná-lo, restaurando os níveis fisiológicos (Klein et al., 1995).

Possivelmente, a concentração de colesterol remanescente na membrana plasmática pode não ter sido inferior a fisiológica, pois maiores concentrações de metil- β -ciclodextrina poderiam retirar uma maior quantidade de colesterol da membrana plasmática, promovendo um aumento da taxa de reação acrossômica nos espermatozoides pós-RAI com ionóforo de cálcio A23187, comparada ao tratamento 1. Por outro lado, poderia reduzir ainda mais a viabilidade espermática (Visconti et al., 1999). Outra alternativa, seria prolongar o

tempo de incubação da metil- β -ciclodextrina com o sêmen descongelado, promovendo maior taxa de remoção do colesterol da membrana plasmática, com o equilíbrio voltado para o lado do complexo de inclusão M β CD-colesterol (Atger et al., 1997). Todavia, um aumento do tempo entre o descongelamento do sêmen e a inseminação artificial poderia prejudicar a viabilidade espermática, visto ser um fator fundamental para o sucesso da utilização do sêmen criopreservado (Watson, 2000).

A incorporação de colesterol na membrana plasmática do espermatozoide equino aumentou a viabilidade dos espermatozoides pós-descongelamento. No entanto, reduziu as taxas de reação do acrossoma. Visto que a taxa de reação acrossômica induzida *in vitro* pode ser indicativo da fertilidade *in vivo* (Landim-Alvarenga et al., 2004; Brinsko et al., 2007), mais estudos devem ser realizados para aumentar a taxa de reação acrossômica *in vitro* sem que haja redução da viabilidade espermática.

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que se realizou o presente experimento e com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que:

1. A inclusão de colesterol nas membranas dos espermatozóides eqüinos promove o aumento da integridade da membrana plasmática pós-descongelamento;
2. A incorporação de colesterol na membrana mitocondrial beneficiou a produção de energia dos espermatozóides móveis;
3. A adição de colesterol no meio diluidor reduz a capacidade de reação do acrossoma das células espermáticas descongeladas, após indução com ionóforo de cálcio.
4. A ciclodextrina exerce um efeito tóxico sobre a viabilidade espermática;
5. A indução da remoção do colesterol da membrana plasmática, da maneira como foi realizada, não melhora a qualidade do sêmen eqüino congelado adicionado de colesterol.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. et al. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, v.89, n. 1-4, p.105–113, 2005.

ÁLVAREZ, A. L.; SERRES, C.; TORRES, P. et al. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 94, n. 1-4, p. 89-91, 2006.

AMANN, R. P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of Andrology*, v. 10, n. 2, p.89-98, 1989.

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 Veterinary Practice*, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. et al. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma membranes in boar sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, n. 2, p. 190-194, 2007.

ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; MANZANO, A. Inseminação artificial de eqüídeos com sêmen congelado em palhetas de 0,5 ml. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA

- VETERINÁRIA, 20, Cuiabá, MT, 1986. *Anais*. Cuiabá, 1986, p. 181.
- ASHWORTH, P. J. C.; HARRISON, R. A. P.; MILLER, N. G. A. et al. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reproduction Fertility Development*, v. 6, n. 2, p. 173-180, 1994.
- ATGER, V. M.; MOYA, M. L.; STOUT, G. W. et al. Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 99, n. 4, p. 773-780, 1997.
- 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, n. 2, p. 185-192, 1997.
- BALL, B. A.; BAUMBER, J.; SABEUR, K. Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 58, n.2-4, p. 299-300, 2002.
- BARRERA-COMPEAN, M. H.; PURDY, P. H.; DZAKUMA, J. M. et al. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves post-thaw goat sperm motility. *Journal of Animal Science*, v.83, suppl. 1, p. 153, 2005. (Abstract).
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames, IA: Iowa University Press, 1989. 285p.
- BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J. et al. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, v.68, n. 3-4, p.181-190, 2001.
- BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J. et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4., p. 301-302, 2002.
- BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A. et al. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 60, n. 7, p. 1239-1247, 2003.
- BAVISTER, B. D.; YANAGIMACHI, R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 16, n. 2, p. 228-237, 1977.
- BAILEY, J.; BILODEAU, J. C.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, v. 21, n.1, p. 1-7, 2000.
- BAZER, F.W.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T. Fertilização, clivagem e implantação. In: HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. Cap. 8, p. 191-193.
- BEDFORD, S. J.; MIRANDA, P. V.; VISCONTI, P. E. Media requirements for stallion sperm capacitation. In: PROCEEDINGS OF A WORK SHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS, 12, 2003, Brewster – Massachusetts, p.50-52.
- BENOFF, S.; HURLEY, I.; COOPER, G. W. et al. Fertilization potential *in vitro* correlated with head-specific mannose ligand receptor expression,

acrosome status e membrane cholesterol content. *Human Reproduction*, v. 8, n. 12, p. 2155-2166, 1993.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, v. 73, n. 10, p. 1338-1344, 2006.

BLOTTNER, S.; WEGNER, I.; ROELANTS, H. et al. Durchflußzytometrische Bestimmung des akrosomalen status von Bullen und Hengstspemien nach markierung mit FITC-konjugiertem PNA (peanut agglutinin). *Tierärztl Umschau*, v. 53, p. 441-447, 1998.

BOGART, R.; MAYER, D.T. The effect of egg yolk on various physical and chemical factors detrimental to spermatozoa viability. *Journal of Animal Science*, v.9, n.2, p.143-152, 1950.

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, n. 1, p.129-136, 2000.

BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; BAUER, J. E. et al. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallion and stallion with unexplained subfertility. *Animal Reproduction Science*, v. 99, n. 1-2, p. 65-71, 2007.

BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; BAUER, J. E. et al. Cholesterol and phospholipid analysis in sperm of stallions with unexplained subfertility. *AAEP Proceedings*, v. 51, 2005. Disponível em:

<http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2005/brinsko/chapter.asp?LA=1>. Acessado em: 20/04/2007.

BUTLER, W. J.; ROBERTS, T. K. Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock or slow cooling. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 43, n. 11, p. 183-187, 1975.

CASEY, P. J.; HILLMAN, R. B.; ROBERTSON, K. R. et al. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *Journal of Andrology*, v. 14, n. 4, p. 289-297, 1993.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. ANDRADE, A. F.C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, p. 1-10, 2007.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J. et al. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, v. 6, n. 2, artigo n. 43, 2005. Disponível on line em www.aapspharmscitech.org. Acessado em 31/10/2006.

CHENG, F. P. *The acrosome reaction in stallion spermatozoa*. 1997. 97f. Tese (Doutorado - Department of Herd Health & Reproduction) - Veterinary Faculty, Utrecht University, Utrecht.

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

- CHRISTENSEN, P.; WHITFIELD, C. H.; PARKINSON, T. J. *In vitro* induction of acrosome reactions in stallion spermatozoa by heparin and A23187. *Theriogenology*, v. 45, n. 6, p. 1201-1210, 1996.
- CHRISTIAN, A. E.; HAYNES, M. P.; PHILLIPS, M. C. et al. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of Lipid Research*, v. 38, n. 11, p. 2264-2272, 1997.
- COCHRAN, J. D.; AMANN, R. P.; FROMAN, D. P. et al. W. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5 °C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, v. 22, n. 1, p. 25-38, 1984.
- COLENBRANDER, B.; BROWERS, J. F. H. M.; NEILD, D. M. et al. Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4, p.341-345, 2002.
- COMBES, G. B.; VARNER, D. D.; SCHROEDER, F. et al. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 56, p. 127-132, 2000.
- COOPER, H. S. Lectins as probes in histochemistry and immunohistochemistry: The Peanut (*Arachis hypogaea*) lectin. *Human Pathology*, v. 15, n. 10, p. 904-906, 1984.
- COX, J. F.; FERNANDEZ, P.; SARAIVA, F. et al. Utilización de lectina *Pisum sativum* y yoduro de propridio para la evaluación rápida de integridad de acrosoma en espermatozoides caprinos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 30, n. 1, p. 93-99, 1998.
- CROSS, N. L. Effect of methyl- β -cyclodextrin on the acrossomal responsiveness of human sperm. *Molecular Reproduction and Development*, v. 53, p. 92-98, 1999.
- CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, v. 59, n. 7-11, p. 7-11, 1998.
- CROSS, N. L.; HANKS, S. E. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Human Reproduction*, v. 6, n.9, p. 1279-1283, 1991.
- CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction*, v. 41, n. 4, p. 635-641, 1989.
- 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.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, v. 14, n.4, p. 466-470, 1977.
- DAVIS, B. K. Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. *Symposium on the pharmacological effects of lipids*. AOCs Monograph n. 5, p. 145-157, 1978.
- DAVIS, B. K. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of

- cholesterol. *Archives of Andrology*, v. 5, n. 3, p. 249-254, 1980.
- DAVIS, B. K.; HUNGRUND, B. J. Effect of modified membrane vesicles from seminal plasma on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 69, n.4, p. 1004-1010, 1976.
- DELPECH, S.; THIBAUT, C. Acquisition of sperm fertilizing ability: epididymal maturation, accessory glands and capacitation. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. *Reproduction in mammals and man*. Paris: Ellipses, 1993. Cap. 14, p. 268-278.
- DENNISTON, D. J.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. et al. The effects of liposomes composed of phosphatidylserine and cholesterol on fertility rates using frozen-thawed equine sperm. *Journal of Equine Veterinary*, v. 17, n. 12, p. 675-676, 1997.
- DIDION, B. A.; DOBRINSKY, J. R.; GILES, J. R. et al. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete research*, v. 22, n. 1, p. 51-57, 1989.
- DROBNIS, E. Z.; CROWE, L. M.; BERGER, T. et al. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using a sperm as a model. *Journal Experimental Zoology*, v. 265, n. 4, p. 432-437, 1993.
- EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. *The Physiology of Reproduction*. 2ed. New York: Raven Press, 1994. Cap. 2, p. 29-77.
- FLESCH, F. M.; BROUWERS, J. F. H. M.; NIEVELSTEIN, P. F. E. M. et al. Bicarbonate stimulated phospholipids scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal Cell Science*, v.114, n.19, p. 3543-3555, 2001.
- FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.
- FRANCAVILLA, F.; VALENTI, M.; ROMANO, R. et al. Relationship between acrosome reactions and hamster egg penetration after ionophore challenge in absence of teratozoospermy. *Fertility and Sterility*, v. 63, n. 6, p. 1301-1305, 1995.
- FREUD, M. Mechanisms and problems the sperm transport. In: _____. *The Regulation of mammalian Reproduction*. Edit. by S.J. Segal, R. Crozier, P.A. Corfman and P.G. Condliffe. Thomas, Springfield, Illinois, p.352, 1973.
- FUNAHASHI, H. Effect of methyl- β -cyclodextrin and fertilization promoting peptide on capacitation of boar spermatozoa in a protein-free medium. *Journal of Reproduction and Development*, v. 48, n. 1, p. 57-63, 2002.
- GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B. Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview. In: PROCEEDINGS OF A WORKSHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS, 12, 2003, Brewster – Massachusetts, p. 43-48.

- GADELLA, B. M.; HARRISON, R. A. P. Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of Reproduction*, v. 67, n. 1, p. 340-350, 2002.
- GADELLA, B. M.; LOPES-CARDOSO, M.; VAN GOLDE, L. M. G. et al. Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction: Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa. *Journal of Cell Science*, v. 108, n. 3, p. 935-945, 1995.
- GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M. et al. Capacitation and acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 68, n.3-4, p. 249-265, 2001.
- GALANTINO-HOMMER, H. L.; ZENG, W-X.; MEGEE, S. O. et al. Effects of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Molecular Reproduction and Development*, v. 73, n. 5, p. 638-650, 2006.
- GARCÍA-MACÍAS, V.; PAZ, P.; MARTINEZ-PASTOR, F. et al. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and sperm-bos-halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *International Journal of Andrology*, v. 30, n.2, p. 1-11, 2006.
- GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A. et al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. *Biology of Reproduction*, v. 34, p. 127-138, 1986.
- GIRAUD, M. N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D. et al. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Human Reproduction*, v. 15, n. 10, p. 2160-2164, 2000.
- GO, K. J. e WOLF, D. P. The role of sterols in sperm capacitation. *Advances in lipid research*, v. 20, p. 317-330, 1983.
- GÓMEZ-CUÉTARA, C.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. *In vitro* induction of the acrosome reaction in fresh and frozen-thawed equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 94, n. 1-4, p. 165-167, 2006.
- GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America Equine Practitioners*, v. 12, n. 1, p. 131-147, 1996.
- GRAHAM, J. K.; CRABO, B. G.; PACE, M. M. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *Journal of Animal Science*, v. 47, Suppl. 2, p. 80-119, 1978.
- GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effects of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull sperm after cold shock and freezing. *Cryobiology*, v. 24, n. 1, p. 42-52, 1987.
- GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, v. 43, n. 1, p. 55-64, 1990.

- GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 67, n. 6, p. 1811-1816, 2002.
- 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.
- HALL, E. A. N. *Neoquímica: A química moderna e suas aplicações*. Porto Alegre: Bookman. 2004. vol. 1.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.
- HEITLAND, A. V.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K. et al. Motility and fertility of stallion sperm cooled and frozen in a modified skim milk extender containing egg yolk and liposome. *Biology of Reproduction Monograph*, v. 1, p. 753-759, 1995.
- HENRY, M.; SNOECK, P. P. N.; COTTORELLO, A. C. P. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4, p. 245-248, 2002.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, n. 1-3, p.3-22, 2000.
- HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *Journal Experimental Zoology*, v. 230, n. 3, p. 473-483, 1984.
- HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 78, n. 2, p. 447-457, 1986.
- HOLT, W. V.; NORTH, R. D. The role of membrane-active lipids in the protection of ram spermatozoa during cooling and storage. *Gamete Research*, v. 19, n. 1, p. 77-89, 1988.
- IBORRA, A.; COMPANYÓ, M.; MARTÍNEZ, P. et al. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 2, p. 378-383, 2000.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; SÖDERQUIST, L. et al. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in swedish dairy bulls. *Theriogenology*, v. 53, n. 4, p. 859-875, 2000.
- JASKO, D. P. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars Veterinaria*, v. 10, n. 2, p. 156-165, 1994.
- JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L. et al. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 37, n. 6, p.1241-1252, 1992.
- 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. *Journal of*

Reproduction and Fertility, v. 70, p. 219-228, 1984.

JONES, C. J. P.; BENBOW, E. W.; KNOX, W. F. et al. Method for showing human spermatogenesis using *Arachis hypogaea* (AHA) lectin. *Journal of Clinical Pathology*, v. 41, n. 9, p. 1017-1018, 1988.

JONES, K. H.; SENFT, J. A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *The Journal Histochemical Cytochemical*, v. 33, n. 1, p. 77-79, 1985.

KATILA, T. *In vitro* evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 42, n. 2, p. 199-217, 2001.

KATILA, T. Interactions of the uterus and semen. *Pferdeheilkunde*, v.5, p.508-511, 1997.

KENNEY, R. M.; BERGMANN, R. V.; COOPER, W. L. et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings. *Proceedings American Association Equine Practice*, v. 21, p. 327-349, 1975.

KILSDONK, E. P. C.; YANCEY, P. G.; STOUDET, G. W. et al. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *The Journal Biological Chemistry*, v. 270, n. 35, p. 17250-17256, 1995.

KIRK, E. S. *Flow cytometric evaluation of stallion sperm*. 2001. 131f. Tese (Master of Science) – Colorado University, Fort Collins.

KLEIN, U.; GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. Alteration of the

myometrial plasma membrane cholesterol content with β -cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry*, v. 34, p. 13784-13793, 1995.

KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytes in the equine uterus. *Theriogenology*, v.41, n.3, p. 629-636, 1994.

KRITHARIDES, L.; KUS, M.; BROWN, A. J. et al. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-mediated efflux of 7-ketocholesterol from macrophage foam cells. *The Journal Biological Chemistry*, v. 271, n. 44, p. 27450-27455, 1996.

KUMAR, M.; BEHERA, A. K.; KUMAR, S.; SNINIVAS, V. R.; DAS, H. R.; SUROLIA, A.; DAS, R. H. Expression, purification and characterization of peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin (PNA) from baculovirus infected insect cells. *Bioscience Reports*, v. 19, n.3, p. 227-234, 1999.

LAGARES, M. A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H. et al. Preservação do sêmen fresco equino: Avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, Porto Alegre, v. 26, n. 1, p. 29-42, 1998.

LAMIRANDE, E.; BELLE-ISLES, M.; GAGNON, C. Characteristics of a seminal plasma inhibitor of sperm motility. *Annals New York Academy of Sciences*, 1988.

LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, v. 2, n. 1, p. 48-54, 1997.

- LANDIM-ALVARENGA, F. C.; GRAHAM, J. K.; ALVARENGA, M. A. et al. Calcium influx into equine and bovine spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Animal Reproduction*, v. 1, n. 1, p. 96 – 105, 2004.
- LANGE, Y.; YE, J.; THEODORE, L. S. How cholesterol homeostasis is regulated by plasma membrane cholesterol in excess of phospholipids. *PNAS*, v. 101, n. 32, 2004. Disponível on line em www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0404766101. Acessado em 20/10/2006.
- LESCHNER, A. *Flowzytometrische Untersuchung der Apoptose humaner Spermatozoen mit Hilfe des Annexin V-tests*. Marburg. 2006. 133f. Tese (Doutorado) – Philipps-Universität Marburg.
- LOMEO, A. M.; GIAMBERSO, A. M. “Water test”: a simple method to assess sperm-membrane integrity. *International Journal of Andrology*, v. 14, n.4, p. 278-282, 1991.
- LONG, J. A.; WILDT, D. E.; WOLFE, B. A. et al. Sperm capacitation and acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. *Biology of Reproduction*, v. 54, n.3, p. 638-646, 1996.
- LOPEZ, M. L.; SOUZA, W. Distribution of fillipin-sterol complexes in the plasma membrane of stallion spermatozoa during the epididymal maturation process. *Molecular Reproduction Development*, v. 28, n.2, p. 158-168, 1991.
- MAGISTRINI, M. Semen evaluation. IN: SAMPER, J. C. *Equine breeding management and artificial insemination*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. Cap.8.
- 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.
- MANN, T. Biochemistry of stallion semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 23, p.47-52, 1975.
- MARDEN, W.; WERTHESTEN, N. T. Influence of seminal fluid on sperm motility. *Fertility and Sterility*, v.7, p.508- 515, 1956.
- MAYER, D. T.; LASLEY, J. F. The factor in egg yolk affecting the resistance, storage potentialities, and fertilizing ability of mammalian spermatozoa. *Journal of Animal Science*, v. 4, n. 3, p. 261-269, 1945.
- MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, v. 14, p. 251-272, 1977.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, v. 247, n.16, p.125-142, 1984.
- MERKIES, K.; CHENIER, T.; PLANTE, C. et al. Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis. *Theriogenology*, v. 54, n. 8, p. 1215-1224, 2000.
- MESEGUER, M.; GARRIDO, N.; MARTÍNEZ-CONEJERO, J. A. et al. Role of cholesterol, calcium and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage alter a cycle of freezing and thawing. *Fertility*

and Sterility, v. 81, n. 3, p. 588-594, 2004.

MEYERS, S. A.; TABLIN, F.; COWE, J. H. Does cellular injury resulting from cryopreservation share traits with sperm capacitation? In: PROCEEDINGS OF A WORK SHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS, 12, 2003, Brewster – Massachusetts, p.70-73.

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.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh Bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *Journal of Animal Science*, v. 84, n.4, p. 826-833, 2006.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, v. 51, n.3, p. 241-249, 2005 (a).

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to stallion sperm improves cryosurvival and osmotic tolerance limits. In: *Proceedings 30th Annu. Mtg. Am. Soc. Androl.*, Seattle, WA. American Society of Andrology, Schaumburg, IL. P.77, abstract 115, 2005 (b).

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 63, n.9, p. 2372-2381, 2005 (c).

MORAN, D. M. Effects of cooling rate and storage temperature on motion characteristics of stallion spermatozoa.

Fort Collins: Colorado State University, 1992.

MORRIER, A.; THÉRIAULT, M.; CASTONGUAY, F. et al. Effect of cholesterol loaded methyl- β -cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold shock and artificial insemination.

NAUC, V. A. Plasma membrane of sperm: cryodamages and cryoprotection. In: 12th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 1992, The Hague – Holanda.

NEILD, D. M. *Evaluation of equine sperm membrane function: effects of cryopreservation*. 2005. 110f. Tese (Doutorado em ...) – Faculty of Veterinary Sciences, Utrecht University, Utrecht.

NEILD, D. M.; GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4, p. 295-298, 2002.

NEUFELD, E. B.; COONEY, A. M.; PITHA, J. et al. Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 35, p. 21604-21613, 1996.

PARINAUD, J.; LE LANNOU, D.; VIEITENZ, G. et al. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit©) following ejaculation. *Human Reproduction*, v. 12, n.11, p. 243-2436, 1997.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on

- sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, n.2, p.209-222, 1992.
- PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, v. 29, n. 2, p. 255-266, 1992.
- PARKS, J. E.; MEACHAM, T. N.; SAACHE, R. G. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. II. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids and viability at 4°C and 37°C. *Biology of Reproduction*, v. 24, n. 2, p. 399-404, 1981.
- 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.; MEYERS. Tyrosine phosphorylation is an indicator of capacitation status in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4, p. 351-354, 2002.
- POMMER, A.C.; RUTLANT, J.; MEYERS, S. A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology*, v. 58, n. 7, p. 1373-1384, 2002.
- POMMER, A. C.; RUTLANT, J.; MEYERS, S. A. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biology of Reproduction*, v. 68, n. 4, p. 1208-1214, 2003.
- PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biology of Reproduction*, v. 71, n.2, p. 522-527, 2004 (a).
- PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of Bull sperm. *Cryobiology*, v. 48, n. 1, p. 36-45, 2004 (b).
- RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. et al. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 2, p. 462 – 470, 2001.
- RODGER, J. C. Seminal plasma an unnecessary evil. *Theriogenology*, v.3, n. 6, p. 237-246, 1975.
- RODGER, J.C.; WHITE, I.G. Free N-acetylglucosamine in marsupial semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.39, n. 2, p. 383-386, 1974.
- ROTTEM, S.; CIRILLO, V. P.; DE KRUFF, B. et al. Cholesterol in *Mycoplasma* membranes. Correlation of enzymic and transport activities with physical state of lipids in membranes *Mycoplasma mycoides* var. *Capri* adopted to grow with low cholesterol concentrations. *Biochemistry Biophysical Acta.*, v. 323, n. 4, p. 509-519, 1973.
- SAENGER, W. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angewandte Chemie International ed. in English*, v. 19, n. 5, p. 344-362, 1980.
- SALING, P.M.; STOREY, B. T. Mouse gamete interaction during fertilization *in vitro*: Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm

- acrosome reactions. *The Journal Cell Biology*, v. 83, n. 3, p. 544-555, 1979.
- 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.
- SAMPAIO, I. B. M. Transformação de Variáveis. In: _____. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. Cap. 16. p. 179-188.
- SCHATZMANN, H. J. The plasma membrane calcium pump of erythrocytes and other animal cells. In: CARAFOLI, E. *Membrane transportation of calcium*. London: Academic Press, 1985. p. 41-108.
- 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.
- SKUTELSY, E.; RANEN, E.; SHALGI, R. Variations in the distribution of sugar residues in the zona pellucida as possible species-specific determinants of mammalian oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 100, n. 1, p. 35-41, 1994.
- SMITH, J. F.; MURRAY, G. R. Evaluation of different techniques for determination of membrane status in spermatozoa. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, v. 57, p. 246-250, 1997.
- SMITH, A.U., POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperature. *Nature*, v.166, p. 668-669, 1950.
- SNOECK, P. P. N. *Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade*. 2003. 116f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K. et al. Cooled and frozen stallion semen. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin n. 9*. Fort Collins: Colorado State University, 1999.
- SUGKRAROEK, P.; KATES, M.; LEADER, A. et al. Levels of cholesterol and phospholipids in freshly ejaculated sperm and Percoll-gradient-pelleted sperm from fertile and unexplained infertile men. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 37, n. 4, p. 820-827, 1991.
- TALBOT, P.; CHACON, R. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *Journal of Experimental Zoology*, v. 215, n. 2, p. 201-208, 1981.
- TALBOT, P.; SUMMERS, R. G.; HYLANDER, B. L. et al. The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A23187. *Journal of Experimental Zoology*, v. 198, n. 3, p. 383-392, 1976.
- TANPHAICHITR, N.; HANSEN, D. Production of motile acrosome reacted mouse sperm with nanomolar concentration of calcium ionophore A23187. *Molecular Reproduction Development*, v. 37, n.3, p. 326-334, 1994.
- TISCHNER, M.; KOSINIAK, K.; BIELANSKI, W. Analysis of the

- pattern of ejaculation in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.41. n.2, p. 329-335, 1974.
- TORRES, P.; SERRES, C.; GÓMEZ-CUÉTARA, C. et al. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the motility and plasma membrane integrity of cooled stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 94, n. 1-4, p. 148-151, 2006.
- TROEDSSON, M. H. T. Uterine response to semen deposition in the mare. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGEOLOGY, 1995. Proceedings. San Antonio, Texas, 1995, p. 130-134.
- VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L. et al. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v. 29, n. 5, p. 1043-1054, 1988.
- VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L. et al. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoa motility parameters. *Theriogenology*, v.28, n. 5, p. 709-723, 1987.
- VARNER, D. D.; THOMPSON, J. A.; BLANCHARD, T. L. et al. Induction of the acrosome reaction in stallion spermatozoa: effects of incubation temperature, incubation time and ionophore concentration. *Theriogenology*, v.58, n. 2-4, p. 303-306, 2002.
- VARNER, D. D.; WARD, C. R.; STOREY, B. T. et al. Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *American Journal Veterinary Research*, v. 48, n. 9, p. 1383-1389, 1987.
- VIDAMENT, M. French field results (1985 – 2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science*, v.89, n. 1-4, 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, n. 2-4, 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.
- VISCONTI, P. E.; GALANTINO-HOMMER, H.; NING, X. P. et al. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 5, p. 3235-3242, 1999.
- VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology Reproduction*, v. 59, n. 1, p. 1-6, 1998.
- WATSON, P. F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 31, n. 1, p. 135-140, 1996.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction and Fertility Development*, v.7, n.4, p.871-891, 1995.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, n. 2, p. 481-492, 2000.

- WEITZE, K. F., PETZOLDT, R. Preservation of semen. *Animal Reproduction Science*, v.28, n.1-4, p.229-235, 1992.
- WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a Review. *Reproduction Fertility Development*, v. 5, n. 6, p. 639-658, 1993.
- WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effects of phosphatidylserine 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.
- WORKING, P. K.; MEIZEL, S. Correlation of increased intraacrosomal pH with the hamster sperm acrosome reaction. *Journal Experimental Zoology*, v. 227, n.1, p. 97-107, 1983.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: _____. *The Physiology of Reproduction*. New York: E. Knobil e JD Neil, 1994, p. 189-317.
- YANCEY, P. G.; RODRIGUESA, W. V.; KILSDONK, E. P. C. et al. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins: Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 27, p. 16026-16034, 1996.
- YEAGLE, P. L. Cholesterol and the cell membranes. *Biochimica Biophysica Acta*, v. 822, p. 267-287, 1985.
- ZAFIAN, P. T. *Plasma membrane alterations induced in bovine spermatozoa by cryopreservation*. M. S. 1984. Tese (Doutorado em...). Colorado State University, Colorado.
- ZAHN, F. S. *Efeito da incorporação de colesterol na membrana plasmática de espermatozoides sobre os parâmetros espermáticos e índice de fertilidade do sêmen congelado na espécie equina*. 2002. 110f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- ZAHN, F. S.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA Jr., J. A. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4, p. 237-240, 2002.
- ZEGINIADOU, T.; PAPADIMAS, J.; MANTALENAKIS, S. Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. *Andrologia*, v. 32, n.9, p. 335-343, 2000.

7. ANEXOS

Anexo 1

MEIOS DILUIDORES

Meio Kenney - Kenney et al. (1975)

Componente	Quantidade
Glicose	49g
Leite em Pó (desnatado)	24g
Penicilina	1.5x10 ⁶ UI
Estreptomicina	1.5g
pH	6,8
Osmolaridade	392 mOsm
Volume final (1 litro)	

Meio INRA 82 - Vidament et al. (1997)

Componente	Quantidade
Leite desnatado UHT	500ml
Glicose	25g
Lactose	1.5g
Rafinose	1.5g
Citrato de Sódio	0.25
Citrato de Potássio	0.41g
Hepes	4.76g
Gema de ovo	20 ml (0,2%)
Glicerol	25 ml (2,5 %)
Sulfato de gentamicina	50 mg
Penicilina G	50.000 UI
pH	6,64
Osmolaridade	356 mOsm
Volume final (1 litro)	

Meio TALP – Bavister e Yanagamachi (1977) modificado por Christensen (1996)

Componente	Quantidade
NaCl	5,844 g/L
KCl	0,2 g/L
NaHCO ₃	0,84 g/L
NaH ₂ PO ₄	0,048 g/L
Na-lactato syrup	2,802 g/L
MgCl ₂ (anidro)	0,047 g/L
HEPES	6 g/L
Glicose	1,087 g/L
Na-Piruvato	10 ml
BSA	6 g/L
Água destilada	1000 ml
pH	7,2
Osmolaridade	280 mOsm

Anexo 2

FICHA DO EXPERIMENTO

Dados da propriedade/proprietário

Nome: _____ Telefone: _____
Endereço: _____
Nome da propriedade: _____

Dados do animal

Data da coleta: _____ Hora da coleta: _____
Nome: _____ Raça: _____ Idade: _____

Características Físicas do sêmen:

Volume: _____ Volume sem gel: _____
Motilidade Total: _____ Motilidade Progressiva: _____
Vigor: _____ Concentração: _____
Morfologia: _____

T1: Tratamento Convencional (Kenney); massinha verde.

T2: Tratamento Colesterol (com colesterol); massinha vermelha.

C-2: Tratamento Controle (sem colesterol); massinha azul.

Avaliação após...	Motilidade / Vigor		
	T1 (Conv.)	T2 (Col.)	C-2 (Cont.)
Diluição em Kenney			
Diluição em TALP	-----		
Incubação em TALP/CLC	-----		
Centrifugação/diluição INRA 82			

Concentração após centrifugação (1700 rpm x 10min):

Número de palhetas congeladas por tratamento: (T1: T2: C-2:)

Análises Laboratoriais:

ANÁLISES	T1 (Convencional)	T2 (Colesterol)	T3 ([MβCD1x])	T4 ([MβCD3x])
Motilidade				
Morfologia				
Integridade funcional da membrana (HOST)				
Viabilidade (IP)				
Integridade do acrossoma (PNA)				
Indução da reação acrossômica (RAI) - Ca ionóforo				

Observações:

Anexo 3

PROTOCOLO FITC-PNA/IP – CITOMETRIA DE FLUXO

- Descongelar a amostra de sêmen a 75°C por 7 segundos, seguido de imersão em banho-maria 37°C por mais 30 segundos;
- Diluir 1:20 em PBS filtrado (0,22 µm) - 250 µL sêmen em 5 mL PBS a 37°C;
- Misturar 200 µL da suspensão + 15 µL (Conc. final 1,125 µg/mL) da solução trabalho de FITC-PNA diluída 1:2;
- Incubar 10 minutos em temperatura ambiente (22°C);
- Adicionar 1 mL PBS + 30 µL PI e incubar por mais 10 minutos (1,5 mM);
- Fazer a leitura no citômetro de fluxo.

Solução Estoque

1500 µg/mL

Solução Trabalho

100 µL da solução estoque + 1 mL PBS (150 µg/mL)

Acrescentar + 1 mL de PBS e pipetar 15 µL nas amostras (75 µg/mL).

Anexo 4

PROTOCOLO DE REAÇÃO ACROSSÔMICA INDUZIDA (RAI)

- Descongelar a amostra de sêmen (1 palheta) a 75°C por 7 segundos, seguido de imersão em banho-maria 37°C por mais 30 segundos;
- Adicionar 5 µL (conc. final 25 nM) da solução trabalho (5µM/mL) em 50 x 10⁶ sptz (1 palheta);
- Incubar por dois minutos;
- Fazer a leitura com FITC-PNA/PI no citômetro de fluxo.

Solução Estoque

Misturar 1 mg de cálcio ionóforo + 2mL DMSO (Concentração: 0,00095 M).

Solução Trabalho

Misturar 5,26 µL + 994,7 µL DMSO (Concentração: 5µM/mL).