

DANIEL MACÊDO RATES

**MEMBRANA PLASMÁTICA: CRIOPRESERVAÇÃO E  
CAPACITAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES EQUINOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Rates, Daniel Macêdo, 1985-  
R233e Membrana plasmática : criopreservação e capacitação de  
2015 espermatozoides equinos / Daniel Macêdo Rates. – Viçosa, MG,  
2015.  
xvii, 106f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.84-103.

1. Cavalos - Reprodução. 2. Membrana plasmática.  
3. Lipídeos. 4. Colesterol. 5. Espermatozoide  
- Criopreservação. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em  
Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.1

DANIEL MACÊDO RATES

**MEMBRANA PLASMÁTICA: CRIOPRESERVAÇÃO E  
CAPACITAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES EQUINOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 7 de dezembro de 2015.

---

José Domingos Guimarães

---

Giancarlo Magalhães dos Santos

---

Felipe Zandonadi Brandão

---

Luciana Navajas Rennó

---

Ciro Alexandre Alves Torres  
(Presidente da Banca)

*Aos meus pais, Márcio Antônio e Emiza,  
por tudo que me ensinaram durante toda  
minha vida, pelo exemplo de dedicação,  
humildade e caráter.*

*Ao meu irmão Mateus pela amizade e  
companheirismo.*

*A Isabela pelo amor, paciência e  
compreensão, e por estar sempre ao meu  
lado.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por toda minha formação profissional, em especial ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade para realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo durante o doutorado.

Ao meu orientador Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho, por todos esses anos em que trabalhamos juntos, pela amizade e compreensão, pelos ensinamentos e por me incentivar a buscar novos conhecimentos no exterior.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo durante os 12 meses de realização do doutorado sanduíche nos Estados Unidos da América.

À Colorado State University (CSU – Fort Collins/CO), por ter me acolhido com apoio e suporte necessários durante a realização do estágio de doutorado sanduíche.

Ao professor James K. Graham, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela amizade, receptividade e confiança durante o período em que realizei o doutorado sanduíche em seu laboratório.

Às estagiárias Katie Laura e Jillian, pela ajuda nos trabalhos realizados no laboratório do Professor James K. Graham.

Ao Prof. Terry Engle e à técnica Karen Sellins, do Animal Sciences da CSU por permitirem a utilização do Cromatógrafo Gasoso e auxílio nas análises em seu laboratório.

Ao pesquisador do Serviço de Pesquisa em Agricultura do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), Phillip Purdy, por permitir utilização do citômetro de fluxo e pela ajuda na realização dos testes de capacitação espermática.

À Kimberly Tarvis, Jennifer Barfield e Paula, pelos ensinamentos.

Aos amigos brasileiros de Fort Collins-CO, Felipe do Valle, Gustavo Zanotto, Juliano Coelho, Lenise Mueller, Mário Aguiar, Rafael Neves, Rafael Siqueira, Felipe Alves, Camy Bauman, Livia Garbin, Izzy Gaulia, Christiane Vilela, André Alves, Marcello Sanzi pelos bons momentos e pela ajuda e companhia nas horas difíceis.

A todos os meus amigos e colegas de aula, funcionários e todos os professores do Departamento de Zootecnia.

À Viçosa, meu segundo lar por 10 anos, onde vivi, aprendi, errei, acertei, cai, levantei, sorri, chorei e cresci.

Aos meus amigos de Viçosa e minha eterna família: Renan Reis de Oliveira, Pedro Gama Ker, Newton Galvão, Emílio Pereira, Thiago Neumann, Rafael Vilela, Nelcino de Paula, Wender Ferreira, Ivan França, Guilherme Pugliesi, Manuela Matta, Maria Gazzinelli, Héliida Monteiro, Grazi Vasconcelos, todas integrantes da República 7 Léguas, Pablo Resende, Rodrigo Ferreira e os demais aqui não citados.

A toda minha família pelo carinho, em especial a minha mãe Emiza e meu irmão Mateus pelo amor, incentivo e apoio durante todos esses anos.

Ao meu pai, que infelizmente não está mais em presença entre nós, mas continua me dando forças para seguir meus passos.

A Isabela, pelo amor, pela paciência e pelo incentivo nos meus estudos apesar da distância que nos separava.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram na minha formação e que contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Muito obrigado!!!

## **BIOGRAFIA**

DANIEL MACÊDO RATES, filho de Márcio Antônio Moreira Rates e Emiza Macêdo Rates, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 03 de setembro de 1985.

Em março de 2004, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

De março de 2009 a fevereiro de 2011, realizou o Programa de Pós-graduação no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Mestrado, concentrando seus estudos na área de Reprodução Animal.

Em março de 2011 ingressou no Programa de Pós-graduação do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em nível de doutorado, concentrando seus estudos na área de Reprodução Animal.

De julho de 2013 a julho de 2014 realizou Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE/CAPEL, na Colorado State University (CSU), em Fort Collins, Colorado – USA.

No dia 07 de dezembro de 2015 se submeteu à defesa da presente tese.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Eventos da criopreservação na célula espermática .....	3
2.2. Crioprotetores .....	6
2.2.1. Classificação .....	7
2.2.1.1. Crioprotetores penetrantes .....	8
2.2.1.2. Crioprotetores não penetrantes .....	10
2.3. Aditivos .....	13
2.3.1. Emulsificantes .....	13
2.3.2. EDTA .....	13
2.4. Meios diluidores para sêmen equino .....	14
2.5. Avaliação computadorizada da motilidade espermática .....	15
2.6. Fertilidade do sêmen congelado equino .....	17
2.7. Colesterol e a membrana plasmática .....	19
2.7.1. Incorporação de colesterol à membrana plasmática .....	20
2.7.2. Efeito do tratamento com colesterol na qualidade do sêmen descongelado .....	22
2.8. Colesterol e fosfolipídeos insaturados na capacitação espermática e fertilidade do sêmen criopreservado .....	26
3. CAPÍTULO 1: FONTES DE ÓLEOS PARA MODIFICAR A COMPOSIÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES EQUINOS E MELHORAR SUA MOTILIDADE APÓS CRIOPRESERVAÇÃO .....	31
3.1. Introdução .....	31
3.2. Experimento 1: Utilização de diferentes fontes de lipídeos incorporados à metil- $\beta$ -ciclodextrina para melhorar motilidade de células espermáticas criopreservadas .....	33
3.2.1. Objetivo .....	33
3.2.2. Material e métodos .....	34
3.2.2.1. Incorporação à metil- $\beta$ -ciclodextrina .....	34
3.2.2.2. Coleta e preparação do sêmen .....	34
3.2.2.3. Análise da motilidade espermática .....	36
3.2.2.4. Análise estatística .....	37
3.2.3. Resultados e discussão .....	37
3.2.4. Conclusões .....	39



3.3. Experimento 2: Utilização de sonicação de diferentes fontes de lipídeos para melhorar motilidade de células espermáticas criopreservadas.....	40
3.3.1. Objetivos .....	40
3.3.2. Material e métodos .....	40
3.3.2.1. Sonicação .....	40
3.3.2.2. Incorporação à metil- $\beta$ -ciclodextrina .....	41
3.3.2.3. Coleta e preparação do sêmen .....	41
3.3.2.4. Análise estatística .....	44
3.3.3. Resultados e discussão .....	44
3.3.4. Conclusões .....	47
3.4. Experimento 3: Utilização da Cromatografia Gasosa para avaliar diferentes métodos de incorporação de lipídeos à membrana plasmática. ....	48
3.4.1. Objetivos .....	48
3.4.2. Material e métodos .....	48
3.4.2.1. Dissolução em etanol.....	48
3.4.2.2. Incorporação à metil- $\beta$ -ciclodextrina .....	48
3.4.2.3. Sonicação .....	49
3.4.2.4. Coleta e preparação do sêmen para análise por cromatografia gasosa .	49
3.4.2.5. Análise estatística .....	52
3.4.3. Resultados e discussão .....	52
3.4.4. Conclusões .....	54
4. CAPÍTULO 2: COLESTEROL E FOSFOLIPÍDEOS NA MEMBRANA ESPERMÁTICA DE GARANHÕES .....	55
4.1. Introdução .....	55
4.2. Material e métodos .....	56
4.2.1. Incorporação à metil- $\beta$ -ciclodextrina .....	56
4.2.2. Coleta e preparação do sêmen para análise de colesterol e fosfolipídeos	56
4.2.3. Extração total de fosfolipídeos .....	58
4.2.4. Análise estatística .....	60
4.3. Resultados e discussão .....	60
4.4. Conclusões .....	62
5. CAPÍTULO 3: ALGUNS ASPECTOS SOBRE CAPACITAÇÃO DO SÊMEN EQUINO.....	63
5.1. Introdução .....	63
5.2. Material e métodos .....	66
5.2.1. Preparação do dilauroilfosfatidilcolina (PC-12) .....	66
5.2.2. Coleta e preparação do sêmen .....	66
5.2.3. Análise estatística .....	68
5.3. Resultados e discussão .....	68
5.4. Conclusões .....	74

6. CAPÍTULO 4: UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DILUIDORES E TEMPOS DE RESFRIAMENTO NO CONGELAMENTO DE SÊMEN EQUINO ....	75
6.1. Introdução .....	75
6.2. Material e métodos .....	77
6.2.1. Coleta e preparação do sêmen .....	77
6.2.2. Análise da motilidade espermática .....	79
6.2.3. Análise estatística .....	79
6.3. Resultados e discussão .....	80
6.4. Conclusões .....	83
7. Referências Bibliográficas .....	84
8. Anexos .....	104
8.1. MW (Modified Whitten's Medium) .....	104
8.2. FR5 Modificado .....	104
8.3. Lactose-EDTA.....	105
8.4. Sacarose-EDTA .....	105
8.5. PBS.....	106
8.6. Composição dos óleos utilizados .....	106

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Concentração de colesterol ( $\mu\text{g}/10^6$  espermatozoides) na membrana plasmática de células tratadas com 0 ou 1,5 mg de CCC/120 x  $10^6$  espermatozoides. A concentração foi determinada antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) o congelamento (n=14). <sup>a,b,c,d</sup> Letras diferentes denotam diferenças entre tratamentos (P<0,05). (Fonte: Moore *et al.*, 2005a). .....21
- Figura 2:** Fórmula estrutural do colesterol (a) e do estigmastanol (b). (Fonte: Sigma-Aldrich®).....33
- Figura 3:** Perfil dos ácidos graxos da membrana plasmática de células espermáticas equinas sem tratamento (CT) ou tratadas com óleo de semente de linho dissolvido em etanol (L1), incorporado à metil- $\beta$ -ciclodextrina (L2) ou sonificado em meio MW (L3). (p>0,05, n=6).....54
- Figura 4:** Esquema da preparação dos tubos para ensaio de ferrotiocianato de amônio e leitura por espectrofotometria. Solução Padrão: 27,03g FeCl<sub>3</sub>6H<sub>2</sub>O; 30,4g NH<sub>4</sub>SCN; 1L de água deionizada. Solução Controle: 10 mg de 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfolcolina em 100 mL de Clorofórmio.....59
- Figura 5:** Concentração de colesterol ( $\mu\text{g}/10^6$  espermatozoides) na membrana plasmática de células sem aditivo (CT), tratadas com 2 mg de ciclodextrina carregada com estigmastanol/120 x  $10^6$  de espermatozoides (CCE), com 2 mg (CCC2), 4 mg (CCC4), 6 mg (CCC6) e 8 mg (CCC8) de ciclodextrina carregada com colesterol/120 x  $10^6$  de espermatozoides. <sup>A,B</sup> nas diferentes colunas indicam diferenças entre os tratamentos (n=16, p<0,05). .....61
- Figura 6:** Relação colesterol:fosfolipídeos na membrana plasmática de espermatozoides equinos sem tratamento (CT), ou tratados com 2 mg (CCC2), 4 mg (CCC4), 6 mg (CCC6) e 8 mg (CCC8) de ciclodextrina carregada com colesterol/120 x  $10^6$  de espermatozoides. <sup>A,B</sup> nas diferentes colunas indicam diferenças entre os tratamentos (n=5, p<0,05). .....61
- Figura 7:** Percentual de células viáveis para sêmen equino fresco sem tratamento (CT), tratado com 20% de plasma seminal (PS) ou com PC-12 40  $\mu\text{M}$  (PC) ao longo do período de incubação (p>0,05, n=5). .....69

**Figura 8:** Percentual de células com acrossoma reagido para sêmen equino fresco sem tratamento (CT), tratado com 20% de plasma seminal (PS) ou com PC-12 40  $\mu$ M (PC) ao longo do período de incubação. \* indica diferença entre tratamentos e o controle num mesmo tempo ( $p < 0,05$ ). Ponto de dado em branco indica diferença com tempo 0 dentro de um mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ,  $n=5$ ). ....70

**Figura 9:** Percentual de células com merocianina elevada para sêmen equino fresco sem tratamento (CT), tratado com 20% de plasma seminal (PS) ou com PC-12 40  $\mu$ M (PC) ao longo do período de incubação ( $p > 0,05$ ,  $n=5$ ). .....71

**Figura 10:** Percentual de células positivas para CoroNa Green no sêmen equino fresco sem tratamento (CT), tratado com 20% de plasma seminal (PS) ou com PC-12 40  $\mu$ M (PC) ao longo do período de incubação. \* indica diferença entre tratamentos e o controle num mesmo tempo ( $p < 0,05$ ). Pontos de dados em branco indicam diferença com tempo 0 dentro de um mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ,  $n=5$ ). .72

**Figura 11:** Percentual de células positivas para Fluo no sêmen equino fresco sem tratamento (CT), tratado com 20% de plasma seminal (PS) ou com PC-12 40  $\mu$ M (PC) ao longo do período de incubação. \* indica diferença entre tratamentos e o controle num mesmo tempo ( $p < 0,05$ ). Pontos de dados em branco indicam diferença com tempo 0 dentro de um mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ,  $n=5$ ). .....73

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Concentrações de CCC utilizadas para tratamento de espermatozóides e qualidade espermática observada após descongelamento para algumas espécies.....24
- Tabela 2:** Efeito da ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) na fertilidade *in vitro*.....29
- Tabela 3:** Efeito do tratamento do sêmen com CCC sobre a fertilidade dos espermatozóides *in vivo*.....30
- Tabela 4:** Percentual de motilidade total (MT) e progressiva (MP) de espermatozóides equinos sem tratamento (CT), tratados com 2 mg de ciclodextrina carregada com colesterol (CCC), 2 mg de ciclodextrina carregada com estigmastanol (CCE), 1, 2 e 3 mg de ciclodextrina carregada com óleo de salmão (S1, S2 e S3) e 1, 2 e 3 mg de ciclodextrina carregada com óleo de semente de linho (L1, L2 e L3) por  $120 \times 10^6$  espermatozóides.....38
- Tabela 5:** Percentual de motilidade total (MT) e progressiva (MP) de espermatozóides equinos sem tratamento (CT) ou tratados com 3 e 6 mg de óleos de salmão (S3 e S6), de semente de linho (L3 e L6), de fígado de bacalhau (B3 e B6), de açafreão-bastardo (A3 e A6) e de gema de ovo de galinha (G3 e G6) sonicados em meio MW antes da utilização na criopreservação convencional...45
- Tabela 6:** Percentual de motilidade total (MT) e progressiva (MP) de espermatozóides equinos sem tratamento (CT), ou tratados com 6 mg de óleos de salmão (S6), de semente de linho (L6), de fígado de bacalhau (B6), de açafreão-bastardo (A6) e gema de ovo de galinha (G6) sonicados em meio MW, e com 2 mg de ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) e estigmastanol (CCE) após incubação (T1), após choque por baixa temperatura (T2) e após congelamento precedido por choque por baixa temperatura (T3).....46
- Tabela 7:** Percentual de motilidade total (MT) e progressiva (MP) de espermatozóides criopreservados em três diferentes diluidores (FR5M, Lactose-EDTA 5% glicerol e Lactose-EDTA 3% metilformamida + 2% glicerol) resfriados por 0 ou 20 minutos a 5°C antes do congelamento.....80
- Tabela 8:** Percentual de motilidade total (MT) e progressiva (MP) de espermatozóides criopreservados em três diferentes diluidores (FR5M, Lactose-EDTA 5% glicerol e Lactose-EDTA 3% metilformamida + 2% glicerol) resfriados por 120 minutos a 5°C em tubos (120T) ou plquetas (120P) antes do congelamento.....81

## RESUMO

RATES, Daniel Macêdo, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2015. **Membrana plasmática: criopreservação e capacitação de espermatozóides equinos.** Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Esta tese compreende quatro capítulos. Todos os estudos aqui relatados foram executados na Colorado State University (CSU), em Fort Collins-CO/USA. Foram utilizados sêmen de seis garanhões com idade entre 15 e 21 anos, das raças Puro-Sangue Inglês, Quarto de Milha e Árabe; estabelecidos no Laboratório de Reprodução Equina da CSU. **Capítulo 1:** dividido em três experimentos. Experimento 1: objetivou-se avaliar efeito do tratamento com 2 mg de ciclodextrina carregada com colesterol e estigmastanol (CCC, CCE); 1, 2 e 3 mg de ciclodextrina carregada com óleo de salmão (S1, S2 e S3) e com óleo de semente de linho (L1, L2 e L3) nas motilidades total (MT) e progressiva (MP) dos espermatozóides após descongelamento. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Experimento 2: objetivou-se avaliar MT e MP do sêmen tratado com diferentes fontes de lipídeos sonicados em meio Whitten's Modificado (MW), após congelamento convencional e congelamento precedido por choque pelo frio; e avaliar efeito do tratamento com 2 mg de CCC e CCE sobre motilidades após choque pelo frio. Os tratamentos usando lipídeos foram: 3 e 6 mg de óleo de salmão (S3 e S6), de óleo de semente de linho (L3 e L6), de gema de ovo de galinha (G3 e G6), de óleo fígado de bacalhau (B3 e B6) e de óleo de açafrão (A3 e A6). Nenhum dos tratamentos utilizando lipídeos melhorou motilidade após congelamento convencional ( $p > 0,05$ ). Para o sêmen submetido a 0 °C por 30 minutos, os tratamentos G6, CCC e CCE melhoraram MT e MP ( $p < 0,05$ ). Experimento 3: utilizou-se cromatografia gasosa para avaliar eficiência dos tratamentos em alterar o perfil de ácidos graxos da membrana espermática. Os tratamentos foram: 6 µg de óleo de semente de linho diluído em etanol (L1); 2 mg de ciclodextrina carregada com óleo de semente de linho (L2) e 6 mg de óleo de semente de linho sonificado em MW (L3). Nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar o perfil de ácidos graxos da membrana espermática ( $p > 0,05$ ). **Capítulo 2:**

objetivou-se mensurar quantidade de colesterol e estabelecer a relação colesterol:fosfolipídeos na membrana plasmática de células espermáticas tratadas com diferentes quantidades de CCC (0, 2, 4, 6 e 8 mg). Foram utilizados kit comercial (Cholesterol Liquicolor, Stanbio Laboratory, Boerne, TX, USA) para mensuração do colesterol e ensaio de ferrotiocianato de amônio para mensuração dos fosfolipídeos totais. A quantidade de colesterol encontrada nas células tratadas com 0, 2, 4, 6 e 8 mg de CCC foram respectivamente 0,22; 0,58; 0,77; 0,91 e 1,07  $\mu\text{g}/10^6$  de espermatozoides, e a relação colesterol:fosfolipídeos para os mesmos tratamentos foram 0,39; 0,72; 1,0; 1,16 e 1,36. A quantidade de colesterol na membrana foi maior a partir do uso de 2 mg de CCC ( $p < 0,05$ ), e a relação colesterol:fosfolipídeos a partir do tratamento com 4 mg de CCC ( $p < 0,05$ ).

**Capítulo 3:** neste estudo o objetivo foi avaliar o comportamento do sêmen sem tratamento (CT) ou tratado com 20% de plasma seminal (PS) e 40  $\mu\text{M}$  de PC-12 (PC) em eventos ligados à capacitação espermática durante incubação por 30 minutos (avaliações foram feitas no tempo 0 – T0, 5 – T5, 15 – T15 e 30 minutos – T30). Para isso cada um dos tratamentos foi submetido a quatro diferentes corantes: 1- CoroNa Green, que quantifica sódio intracelular (CG); 2- Fluo-3, que quantifica cálcio intracelular (Fluo); 3- FITC-PNA, que quantifica reação acrossômica (FP) e 4- Merocianina, que caracteriza fluidez/desorganização da membrana plasmática (Mero). Yo-Pro-1 ou iodeto de propídeo foram utilizados para avaliar integridade de membrana plasmática. As amostras foram lidas em citometria de fluxo. O tratamento com PC-12 aumentou o percentual de células com acrossoma reagido, detectada na avaliação aos 30 minutos. Este percentual, de 33%, foi maior que o dos demais tratamentos no mesmo tempo (CT: 13% e PS: 4%) e superior aos percentuais para o próprio PC-12 nos tempos 0 (7%), 5 (9%) e 15 minutos (16%). Com relação à fluidez da membrana plasmática não houve diferença no percentual de células com merocianina elevada entre os diferentes tratamentos, nem entre um mesmo tratamento ao longo do tempo ( $p > 0,05$ ). O estudo revelou efluxo de sódio das células espermáticas equinas viáveis após 15 minutos de incubação, sendo que nos tempos 15 e 30 minutos o percentual de células positivas para CG foram menores para tratamento com plasma seminal

(8,8 e 4,8%) e maiores para tratamento com PC-12 (36 e 15,4%), em relação ao controle (23,6 e 11,8%,  $p < 0,05$ ). Após 15 minutos de incubação o sêmen dos três tratamentos apresentou percentual de células positivas para Fluo superior ao tempo 0, porém o plasma seminal retardou a entrada deste íon nas células, visto que, no T15 percentual de células Fluo+ foi menor que nos outros tratamentos (CT: 87%; PS: 59% e PC: 95%,  $p < 0,05$ ), voltando a se igualar no tempo 30 minutos (CT: 98%; PS: 85% e PC: 97%,  $p > 0,05$ ). O meio MW utilizado foi capaz de induzir efluxo de sódio e influxo de cálcio, alterações que caracterizam capacitação espermática. **Capítulo 4:** os objetivos aqui foram avaliar eficiência de diluidores a base de gema de ovo (Lactose-EDTA) ou gema de ovo associada a leite em pó (FR5 modificado – FR5M) e eficiência do glicerol (GLI) ou da combinação deste com metilformamida (MF) em manter MT e MP dos espermatozóides após congelamento usando diferentes protocolos (0: congelamento sem resfriamento; 20: resfriamento em palhetas por 20 minutos a 5 °C antes do congelamento; 120T: resfriamento do sêmen em tubos por 120 minutos a 5 °C; 120P: resfriamento do sêmen em palhetas por 120 minutos a 5 °C). O FR5M preservou melhor a MP de células espermáticas em todos os protocolos de congelamento utilizados, mostrando benefício da combinação da gema de ovo com leite em pó no diluente de congelamento (15%, 21%, 26% e 25% para 0, 20, 120T e 120P, respectivamente, vs. 9%, 14%, 19% e 17%, para lactose-EDTA,  $p < 0,05$ ). A utilização de Lactose-EDTA 5%GLI apresentou resultados superiores para MT e MP se comparado ao mesmo diluidor com 3%MF + 2%GLI, o que mostra que o glicerol é um crioprotetor que pode ser utilizado em diferentes protocolos de congelamento (MT para Lactose-EDTA 5%GLI = 33%, 45%, 56% e 53% para 0, 20, 120T e 120P vs. 20%, 30% 35% e 36% para Lactose-EDTA 3%MF+ 2%GLI,  $p < 0,05$ ; MP para Lactose-EDTA 5%GLI = 19% e 17% para 120T e 120P vs. 11% e 10% para Lactose-EDTA 3%MF+ 2%GLI,  $p < 0,05$ ). O resfriamento do sêmen antes do congelamento pode ser realizado tanto em tubos quanto em palhetas de 0,5 mL, sem prejuízos às motilidades total e progressiva do sêmen após congelamento.



## ABSTRACT

RATES, Daniel Macêdo, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2015.  
**Plasmatic membrane: cryopreservation and capacitation of equine sperm.**  
Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho.

This thesis is compounded by four chapters. All work reported here were performed at Colorado State University (CSU), located in Fort Collins, CO / USA. Six stallions between 15 and 21 years old (Thoroughbred, Quarter Horse and Arabian breeds) and stabled at Equine Reproduction Laboratory at CSU were used in all experiments. **Chapter 1:** comprised by three experiments. Experiment 1: aimed to evaluate the effects on total motility (TM) and progressive motility (PM) after semen thawing from treatments with 2 mg of cyclodextrin-loaded-cholesterol and 2 mg of cyclodextrin-loaded-stigmastanol (CLC, CLS); 1, 2 and 3 mg of cyclodextrin-loaded-salmon oil (S1, S2 and S3); and 1, 2 and 3 mg of cyclodextrin-loaded-flax seed oil (F1, F2, and F3). No differences among treatments were detected ( $p>0.05$ ). Experiment 2: aimed to evaluate TM and PM of semen treated with different sonicated lipids into Modified Whitten's Medium (MW), after conventional freezing and freezing preceded by cold shock, and assess the effect of treatment with 2 mg of CLC and CLS on motility after cold shock. Treatments using lipids were: 3 and 6 mg of salmon oil (S3 and S6); 3 and 6 mg of flax seed oil (F3, F6); 3 and 6 mg of egg yolk (E3 and E6); 3 and 6 mg of cod liver oil (C3 and C6), 3 and 6 mg of safflower oil (SF3 and SF6). None of the lipid treatments improved motility after conventional freezing ( $p>0.05$ ). For semen subjected to 0 °C for 30 minutes, TM and PM increased in semen treated with E6, CLC and CLS ( $p<0.05$ ). Experiment 3: gas chromatography was used to evaluate effectiveness of treatments in altering the sperm membrane fatty acid profile. The treatments were: 6 µg of flax seed oil diluted with ethanol (F1); 2 mg of cyclodextrin-loaded- flax seed oil (F2) and 6 mg of flax seed oil sonicated in MW (F3). None of the treatments was able to change fatty acid profile in the sperm membrane ( $p>0.05$ ). **Chapter 2:** aimed to measure the amount of cholesterol and to establish the cholesterol:phospholipids ratio in plasma membrane of fresh equine sperm cells

treated with different amounts of CLC (0, 2, 4, 6 and 8 mg). A commercial kit was used to measure cholesterol (Cholesterol Liquicolor, Stanbio Laboratory, Boerne, TX, USA) and an ammonium ferrocyanate assay for total phospholipids measurement. Amount of cholesterol found for cells treated with 0, 2, 4, 6 and 8 mg CLC were, respectively, 0.22; 0.58; 0.77; 0.91 and 1.07 micrograms/ $10^6$  sperm, and cholesterol:phospholipids ratios to the same treatments were 0.39; 0.72; 1.0; 1.16 and 1.36, respectively. Increase in cholesterol amount was observed when 2 mg of CLC was used ( $p < 0.05$ ), and cholesterol:phospholipids ratio was higher with 4 mg of CLC ( $p < 0.05$ ). **Chapter 3:** in this study the objective was to evaluate the response of fresh equine semen without treatment (CT) or treated with 20% of seminal plasma (SP) and 40  $\mu$ M PC-12 (PC) in events related to sperm capacitation during incubation for 30 minutes (evaluations made at time 0 - T0, 5 - T5, 15 - T15 and 30 minutes - T30). Each treatment was subjected to four different dyes: 1- CoroNa Green, which measures intracellular sodium (CG); 2- Fluo-3, which measures intracellular calcium (Fluo); 3- FITC-PNA, which measures acrosome reaction (FP) and 4- Merocyanine, which characterizes plasma membrane fluidity/destabilization (Mero). Yo-Pro-1 or propidium iodide were used to assess cell membrane integrity. Samples were read in flow cytometry. An increased percentage of cells with reacted acrosome was observed in semen treated with PC-12 at T30. This proportion (33%) was higher than the other treatments at the same time (CT: 13% and SP: 4%) and higher than the proportion for PC-12 at T0 (7%), T5 (9%) and T15 (16%). There was no difference in the percentage of cells with high merocyanine between different treatments or between the same treatment over time ( $p > 0.05$ ). The study showed sodium efflux after 15 minutes incubation, and at times 15 and 30 minutes the percentage of positive cells for GC were lower in SP treatment (8.8 and 4.8%) and higher for PC-12 (36 and 15.4%) compared to the CT (23.6 and 11.8%,  $p < 0.05$ ). At T15 the semen of all treatments showed higher proportion of Fluo positive cells than T0, but seminal plasma delayed entry of the ion into the cells, since at T15 Fluo proportion of positive cells was lower than the other treatments (CT: 87%; SP: 59% and PC: 95%,  $p < 0.05$ ) and became similar at T30 (CT = 98%, SP= 85% and PC=97%,  $p >$

0.05). The semen extender used was able to inducing sodium efflux and calcium influx, changes characterizing sperm capacitation. **Chapter 4:** the objectives were to evaluate efficiency of an egg yolk-based medium (lactose-EDTA) or egg yolk associated with powdered milk (modified FR5 - MFR5), and efficiency of glycerol (GLY) or a combination between GLY and dimethylformamide (MF) to maintain TM and PM sperm after freezing using different protocols (0: no cooling; 20: cooling straws for 20 minutes at 5 °C before freezing; 120T: cooling in tubes for 120 minutes at 5 °C; and 120P: cooling in straws for 120 minutes at 5 °C). MFR5 preserved PM in all freezing protocols, showing the benefit of the combination of egg yolk with powdered milk for freezing diluent (15%, 21%, 26% and 25% for 0, 20, 120T and 120P, respectively, vs. 9%, 14%, 19% and 17% for lactose-EDTA,  $p < 0.05$ ). The use of lactose-EDTA 5%GLY showed superior results for TM and PM if compared to the same medium with 3%MF + 2%GLY, indicating that glycerol is a cryoprotectant that can be used in several different freezing protocols (TM for Lactose-EDTA 5%GLY = 33%, 45%, 56% and 53% for 0, 20, 120T and 120P vs. 20% 30% 35% and 36% for LactoseEDTA 3%MF + 2%GLY,  $p < 0.05$ ; MP for Lactose-EDTA 5%GLY = 19% and 17% at 120T and 120P vs. 11% and 10% for Lactose-EDTA 3%MF + 2%GLY,  $p < 0.05$ ). The cooling before freezing can be performed either in tubes as in 0.5 mL straws for 120 minutes, without damage to total and progressive motility of thawed semen.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Segundo a Divisão de Estatística da FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (2013), o Brasil possui 5.312.076 de cabeças de equinos, que corresponde a 8,9% da população equina mundial (59.769.280) e 39% da população equina da América do Sul (13.570.252).

Em 2010, a CNA (Confederação de Agricultura e Pecuária do Brasil) fez um levantamento da real importância da equideocultura dentro de vários aspectos no Brasil, e revelou que o setor da equinocultura gera aproximadamente 642 mil empregos diretos e 2,6 milhões de empregos indiretos. Boa parte destes empregos interfere no aspecto social da manutenção de famílias no ambiente rural. Com uma movimentação financeira de R\$ 7,5 bilhões por ano, que supera movimentação gerada por produtos amplamente divulgados no país, como a cachaça e o café torrado, a equideocultura nacional vem demonstrando sua importância econômica.

Cavalgadas, exposições, feiras, leilões, competições equestres, dentre outros eventos, ressaltam o contexto cultural do cavalo no Brasil. Cada região apresenta suas características e particularidades em relação à utilização dos cavalos e eventos equestres, mas é fato que em todos os pontos do país os cavalos são estimados, e fazem parte da história, das diferentes manifestações culturais e do lazer dos brasileiros.

Assim sendo, as biotécnicas de reprodução como inseminação artificial, transferência de embrião e criopreservação de gametas e embriões têm valor e papel fundamental para dar apoio ao melhoramento genético na espécie equina, independente da raça e das funções propostas para esses animais.

A redução da fertilidade com utilização do sêmen criopreservado equino é atribuída a eventos ocorridos durante o congelamento/descongelamento das células espermáticas, onde cerca de 10 a 50% dos espermatozoides do ejaculado não resistem e morrem. Os procedimentos de congelamento/descongelamento do sêmen ocasionam danos celulares devido à mudança na temperatura, formação

de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozóide, lesões no DNA, estresse osmótico, além da toxicidade de alguns crioprotetores. Muitos desses danos são decorrentes de alterações da membrana, que passa por uma fase de transição do estado líquido-cristalino para o estado gel durante o processo de refrigeração (Graham, 1996; Watson, 2000; Ball & Vo, 2001).

Os objetivos dos trabalhos realizados foram incorporar lipídeos à membrana espermática, por diferentes métodos, para melhorar a motilidade espermática pós-descongelamento; avaliar o efeito de diferentes meios diluidores de congelamento e curvas de resfriamento na motilidade espermática pós-descongelamento; quantificar o teor de colesterol incorporado à membrana plasmática de espermatozóides a fresco, tratados com diferentes concentrações de ciclodextrina carregada com colesterol e avaliar diferentes eventos que ocorrem durante a capacitação espermática no sêmen a fresco tratado com plasma seminal ou dilaurilfosfatidilcolina.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Eventos da criopreservação na célula espermática

À temperatura corporal, os lipídeos e as proteínas de membrana permanecem em estado de fluidez, onde são capazes de se moverem uns entre os outros bilateralmente (Amann & Pickett, 1987). No processo de criopreservação, o sêmen deve ser primeiramente resfriado da temperatura corpórea (37 °C) à temperatura ambiente (cerca de 20 °C, em um laboratório climatizado). Este resfriamento aparentemente não causa danos aos espermatozóides, desde que estes estejam diluídos em meio adequado.

Existe, porém, uma faixa crítica de temperatura no processo de refrigeração, entre 19 e 8 °C, em que o espermatozóide pode ser severamente lesionado (Moran *et al.*, 1992). O resfriamento nesta faixa de temperatura faz com que os lipídeos da membrana plasmática passem por uma fase de transição do estado líquido-cristalino para o estado gel (Graham, 1996). Neste ponto as cadeias de ácidos graxos que estavam aleatoriamente distribuídas ordenam-se paralelamente, produzindo uma estrutura rígida e tornando essas áreas fracas e suscetíveis a rupturas e a fusões, como também permeáveis a íons (Hammerstedt *et al.*, 1990).

Se esse resfriamento for realizado de maneira inadequada, pode ocorrer um choque térmico, que causa prejuízos irreversíveis aos espermatozóides, como a rápida perda de motilidade; movimento circular; redução do metabolismo; danos à membrana plasmática devido ao aumento da permeabilidade, o que leva à perda de íons e moléculas intracelulares; e danos acrossômicos, como edemaciamento e irregularidades do acrossoma (Amann & Pickett, 1987; Watson, 1995, 2000).

Quando o sêmen é resfriado abaixo de 5 °C o meio que circunda os espermatozóides e os próprios sofrem um super-resfriamento (Amann & Pickett, 1987). De -6 °C a -15 °C, a água no meio extracelular começa a cristalizar e a concentração de soluto na fração descongelada aumenta, aumentando a pressão osmótica no espaço extracelular com consequente desidratação celular (Amann &

Pickett, 1987; Amann & Graham, 1993). Neste ponto, a queda de temperatura deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato prolongado da célula desidratada com o meio hiperosmótico. Uma desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula até ocorrer um colapso da membrana (Medeiros *et al.*, 2002).

Quando alcançam a temperatura crítica de -60 °C os espermatozoides ficam relativamente inertes e o sêmen pode ser imerso em nitrogênio líquido, para seu armazenamento (Parks & Graham, 1992; Graham, 1996). Mesmo à temperatura de -196 °C no nitrogênio líquido, ainda existem canais de água descongelada, contendo concentrações de sais extremamente altas. A concentração de sais numa solução salina dita fisiológica (NaCl), que é em torno de 0,15 M em temperatura ambiente, pode aumentar para até 2,6 M quando a temperatura é reduzida para -10 °C. Somente espermatozoides que residem nesses canais sobrevivem à criopreservação (Mazur, 1977; Amann & Pickett, 1987).

De acordo com Amann & Pickett (1987), as lesões causadas pelo frio podem ser agrupadas em duas categorias: 1) lesões diretas, evidenciadas após curto período de armazenamento a baixas temperaturas, sendo esta dependente principalmente das taxas de resfriamento (maiores lesões são induzidas pelo rápido resfriamento se comparado ao resfriamento a taxas mais lentas); e 2) lesões indiretas ou latentes, que são evidentes somente após tempo mais prolongado de armazenamento, e são independentes da taxa de resfriamento. Os autores concluem que ambos os danos diretos e indiretos são manifestações diferentes do mesmo espectro de alterações.

Segundo bases físico-químicas, a lesão celular causada durante os processos de congelamento e descongelamento é devida à formação de cristais de gelo no interior do espermatozoide, que afetam a estrutura da célula. Ainda, as altas concentrações de sais no meio durante o congelamento podem desidratar excessivamente o espermatozoide, levando a deformações celulares, danos à estrutura da membrana, deslocamento e desnaturação de suas proteínas, e desarranjo de estruturas do citoesqueleto (Amann & Pickett, 1987; Graham, 1996;

Watson, 2000). Por isso é importante levar em consideração a curva de congelamento para se minimizar esses danos e eventos que são inevitáveis durante a criopreservação.

Com relação à curva de congelamento, no resfriamento lento (-25 °C a -40 °C/min), o espermatozóide tem tempo suficiente para se desidratar devido à alta concentração de solutos no meio extracelular, e não se formam grandes cristais de gelo intracelulares. Esta desidratação pode resultar em altas concentrações intracelulares de soluto, provocando o chamado efeito solução, prejudicial às células espermáticas (Amann & Pickett, 1987; Watson, 1995).

Por outro lado, numa curva de resfriamento rápida (> -60 °C/min), a água não tem tempo suficiente para sair da célula, e em algum ponto abaixo de -10 °C a célula sofrerá o congelamento interno. A extensão dos danos causados pelos cristais de gelo intracelulares dependerá 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.

Congeladores programáveis são convenientes para o congelamento de grandes quantidades de palhetas de sêmen, e ainda programam e controlam a curva de congelamento. Por exemplo: de 4 a 5 °C por 4 min.; de -5 a -110 °C por 25 min.; de -110 a -140 °C por 35 min.; e somente então as palhetas de sêmen são mergulhadas em nitrogênio líquido (Purdy, 2006).

Realizado o congelamento do sêmen, agora se deve pensar no seu descongelamento, e a curva de descongelamento é importante para minimizar os danos causados aos espermatozóides, sendo dependente da curva de congelamento utilizada.

Espermatozóides congelados em curva lenta requerem uma curva de descongelamento lenta, para permitir o descongelamento dos cristais de gelo extracelulares e a diluição dos solutos no meio, e, lentamente, reidratação das células. Se o sêmen for descongelado muito rápido, os cristais extracelulares descongelam-se rapidamente e a água do meio invade bruscamente as células,



causando engurgitamento e danos à membrana plasmática (Amann & Pickett, 1987; Holt, 2000).

Já as células congeladas em 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, evitando que pequenos cristais cresçam e causem danos severos (Mazur, 1984; Amann & Pickett, 1987; Pickett & Amann, 1992; Graham, 1996).

Dentre os fatores que afetam o descongelamento estão o tipo de envase, espessura da parede da palheta, condutividade de calor da mesma e a temperatura utilizada (Amann & Pickett, 1987).

## **2.2. Crioprotetores**

Na criopreservação de sêmen equino, os crioprotetores devem ser adicionados ao meio para que haja proteção ao espermatozóide durante o congelamento e descongelamento. Estas substâncias são importantes para minimizar a formação de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico pela reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelamento da água, assim como servir como tampão, ajustando as alterações de pH (Squires *et al.*, 1999; Medeiros *et al.*, 2002).

Os sistemas tampões devem ser um dos constituintes dos diluidores, pois o metabolismo dos espermatozoides resulta em produção de catabólitos tóxicos que contribuem para o aumento do ácido láctico no meio extracelular, tornando o meio ácido e reduzindo a longevidade e capacidade de fertilização dos espermatozoides. O pH ótimo para os espermatozoides é próximo da neutralidade, portanto a maioria dos diluidores é tamponado com pH entre 6,9 e 7,1 (Oliveira, 2003).

A estrutura molecular é um parâmetro importante para determinar a eficiência dos crioprotetores, visto que devem possuir grupamentos amina e hidroxila em sua composição para apresentarem afinidade pela água e favorecerem a

formação de pontes de hidrogênio. Estas ligações alteram a orientação das moléculas de água dos cristais de gelo, criando ambiente menos prejudicial às células (Dalimata & Graham, 1997; Baudot *et al.*, 2002).

Embora a concentração de crioprotetor seja elevada no meio, sua difusão é 30 a 60 vezes menor do que a da água. Dessa forma, estas moléculas atravessam a membrana até atingir o equilíbrio numa velocidade menor que a água, ocasionando o enrugamento da célula devido à rápida saída de água para diluir a elevada concentração externa, e somente com o passar do tempo o crioprotetor penetra e equilibra as concentrações intra e extracelulares. Nessas condições, a água retorna ao interior da célula até atingir o equilíbrio, resultando na retomada do seu tamanho normal (Graham, 1996; Seidel, 1996).

Embora imprescindíveis para a sobrevivência dos espermatozoides no processo de congelamento, algumas substâncias crioprotetoras utilizadas na criopreservação de outros tipos celulares são impróprias para a célula espermática e podem apresentar efeitos tóxicos. Ainda, quando em elevadas concentrações, os crioprotetores podem reduzir a capacidade fertilizante deste gameta devido à lesão por danos osmóticos (Graham, 1996; Watson, 2000).

### **2.2.1. Classificação**

Os crioprotetores podem ser divididos em duas classes: crioprotetores penetrantes e não penetrantes.

Os penetrantes são aqueles que têm a capacidade de atravessar a membrana plasmática do espermatozoide devido a seu pequeno tamanho molecular, atuando, assim, nos meios intra e extracelular. São: o glicerol, o propilenoglicol, o etilenoglicol, a acetamida, dimetilformamida e outras amidas, o 1,2- propanodiol e o dimetilsulfóxido.

Os não penetrantes não têm a capacidade de atravessar a membrana plasmática devido ao seu maior tamanho molecular. São: as proteínas presentes no leite e na gema de ovo, os açúcares não penetrantes como lactose, sacarose,

manose, rafinose e trealose, os polímeros sintéticos, como polivinilpirrolidona e metilcelulose, e albumina sérica bovina (Amann & Pickett, 1987).

### **2.2.1.1. Crioprotetores penetrantes**

Os crioprotetores penetrantes, ou permeantes, atuam por suas propriedades coligativas, reduzindo a temperatura de congelamento intracelular. Desta forma, maior quantidade de água vai permanecer no estado líquido quando a célula espermática for submetida a baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular de solutos e proporcionando, assim, um ambiente menos deletério durante o congelamento (Watson, 1995).

O glicerol vem sendo utilizado com maior frequência no congelamento de sêmen equino, sendo sua adição executada a 37 °C ou a 5 °C, fracionada ou não. Apesar de seu mecanismo de ação não se encontrar perfeitamente esclarecido, sabe-se que este crioprotetor penetra na membrana celular por difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma, visto que, semelhante aos agentes não penetrantes, proporciona desidratação celular por seu efeito osmótico extracelular (Leboeuf *et al.*, 2000).

Em uma solução contendo glicerol, no momento em que ocorrer o congelamento, restará mais água descongelada do que naquela que não contenha glicerol, resultando no aumento do volume dos canais de solventes não congelados e na menor concentração de sais nesses canais (Baudot *et al.*, 2002).

Além do seu efeito osmótico, o glicerol parece atuar diretamente na membrana plasmática, havendo evidências de que se liga a fosfolipídeos e reduz a fluidez da membrana, interagindo com ligações protéicas e glicoprotéicas da membrana (Parks & Graham, 1992).

O efeito tóxico do glicerol tem sido relatado por muitos autores, sendo responsável por desnaturação de proteínas, por alteração nas interações de actina no citoesqueleto, por eventos citoplasmáticos devido ao aumento da viscosidade pelo glicerol intracelular, pela polimerização da tubulina, associação de

microtúbulos, além de alterações no glicocálix e nas proteínas da superfície celular (Alvarenga *et al.*, 2000b).

Curry (2000) sugere que uma proteína canal, a Aquaporina 7 (AQP7), presente na membrana de células espermáticas, pode ser responsável por uma possível rota pelo qual o glicerol atravessa a membrana espermática. Assim, uma quantidade maior ou menor, ou a falta dessa proteína explicaria, em parte, as diferenças na sensibilidade entre espécies e indivíduos frente ao glicerol como crioprotetor.

Ao estudar o efeito de diferentes crioprotetores em ejaculados de garanhões, Alvarenga *et al.* (2000b) demonstraram semelhança no efeito da adição de etilenoglicol e glicerol, apesar de relatarem que, quando utilizados em conjunto, possibilitam a redução da concentração de glicerol e, conseqüentemente, diminuem os danos causados pelo efeito tóxico.

O dimetilsufóxido também é muito usado como crioprotetor, visto que, penetra rapidamente na membrana plasmática. Para que um soluto atue desta maneira, é necessário que seja solúvel à membrana, assim como em água. Este crioprotetor apresenta como inconveniente a capacidade de causar alterações na membrana, as quais danificam e inviabilizam as células, tornando os demais crioprotetores penetrantes tóxicos para as células (Wolfe & Bryant, 2001).

Alvarenga *et al.* (2000a) constataram equivalência de resultados com uso de glicerol, etilenoglicol e dimetilformamida, sendo que o dimetilsufóxido proporcionou resultado inferior aos demais.

Segundo alguns pesquisadores, o uso das amidas como crioprotetores penetrantes nos diluidores seminais para o sêmen de equinos melhora a motilidade espermática pós-descongelamento e preserva melhor a integridade da membrana plasmática, em relação ao uso do glicerol como crioprotetor. Além disto, permite o uso de sêmen de garanhões que têm resultados de baixa congelabilidade com o glicerol como crioprotetor (Alvarenga *et al.*, 2005; Vidament *et al.*, 2009).

A dimetilformamida e a metilformamida são crioprotetores que vêm sendo utilizados com grande sucesso. Todavia, seu uso para congelamento de sêmen de

garanhões com boa congelabilidade não proporciona aumento da motilidade, mas resultados semelhantes aos do glicerol. Assim, levando em consideração a grande variação que temos entre animais, a utilização desses agentes para sêmen de garanhões com baixa resistência ao processo de criopreservação manifesta melhores resultados quando comparados aos do glicerol (Gomes *et al.*, 2002a).

Gibb *et al.* (2013) observaram aumento na motilidade total e diminuição da fragmentação do DNA quando se utilizou a dimetilformamida em substituição ao glicerol. Ainda, observaram viabilidade espermática decrescente com utilização de 2, 3 e 4% tanto da dimetilformamida quanto do glicerol.

Papa *et al.* (2002), associando dimetilformamida e glicerol (diluidor MP50), proporcionaram uma melhora na proteção da célula espermática durante o congelamento. Ressalta-se que o uso combinado de crioprotetores confere maior proteção do que o uso isolado (Dalimata & Graham, 1997), e as combinações qualitativas e quantitativas são inúmeras, dadas a quantidade de compostos utilizados como crioprotetores.

Hoffmann *et al.* (2010) trabalhando com glicerol, etilenoglicol, dimetilformamida e metilformamida isoladamente como crioprotetores concluíram que 2 ou 3% (600-950 mOsm) foram as melhores concentrações para se manter motilidade progressiva, e 2% (600-750mOsm) foi a melhor concentração para se manter a viabilidade da célula espermática. Quando na concentração de 2% o glicerol preservou melhor os espermatozóides que os demais agentes. Os autores sugeriram ao final do estudo que quando se quer comparar crioprotetores diferentes, isoladamente, deve-se levar em conta a melhor concentração de cada um para se evitarem falsos resultados.

#### **2.2.1.2. Crioprotetores não penetrantes**

O uso de gema de ovo em diluentes para criopreservação de sêmen foi relatado primeiramente por Phillips, em 1939, por proporcionar efeitos benéficos em sêmen bovino. A partir daí se adotou a gema de ovo como um agente de

proteção para ajudar os espermatozóides de várias espécies a resistir à queda de temperatura, inclusive de equinos (Lardy & Phillips, 1939; Martin *et al.*, 1979).

Os lipídeos são os componentes primários da gema de ovo, correspondendo a 65% da matéria seca. São compostos de 65% de triglicerídeos, 29% de fosfolipídeos (sendo 86% fosfatidilcolina e 14% fosfatidiletanolamina), 5% de colesterol, e menos de 1% de ácidos graxos livres (Anton *et al.*, 2007).

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são consideradas responsáveis pelo efeito crioprotetor da gema do ovo, aderem à superfície da membrana celular durante o processo de criopreservação, restaurando a perda de fosfolipídeos e, aparentemente, induzindo alteração transitória de sua composição, o que previne a ruptura da mesma (Farstard, 1996; Moussa *et al.*, 2002). Os diluentes usados na criopreservação de sêmen equino possuem entre 2 e 20 % de gema de ovo.

Atualmente existe uma tendência em se substituir a gema de ovo pelo plasma da gema de ovo (obtido pela centrifugação da gema), pois o plasma pode ser esterilizado por raios gama, é mais prático e não contém alguns compostos que podem ser deletérios ao sêmen que estão presentes na gema integral (Pillet *et al.*, 2011).

No mesmo sentido, Papa *et al.* (2010) substituíram a gema de ovo por lecitina de soja (10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0 g/L). A lecitina manteve a viabilidade dos espermatozóides, porém as taxas de prenhez foram maiores com uso do diluidor Botu-Crio com a gema de ovo. Isto é provavelmente relacionado à diferença entre a composição de gema de ovo e da lecitina de soja. Talvez haja uma ligação irreversível dos lipídeos da lecitina com a membrana plasmática, que mantém a motilidade e viabilidade, mas reduzem a fertilidade por alguma falha na capacitação espermática, que não foi avaliada pelos autores.

Além do ovo, o leite é utilizado rotineiramente em diluidores para armazenar o sêmen, refrigerá-lo, ou para centrifugar o sêmen pré-congelamento. As lipoproteínas do leite têm a capacidade de estabilizar elementos protéicos da membrana do espermatozóide. Essa estabilização é fundamental nos processos de congelamento e descongelamento (Watson, 1981).

Segundo Purdy (2006), a escolha do açúcar a ser incluído no diluidor de congelamento deve ser baseada na sua funcionalidade e propriedades químicas. Dentre os açúcares utilizados nos meios diluidores para criopreservação de sêmen estão os açúcares simples, como a frutose e a glicose (principais fontes de energia para a célula espermática), e os açúcares não penetrantes (citados anteriormente).

Além de atuarem como crioprotetores, os açúcares atuam como substrato energético para o espermatozóide durante o período de incubação, e conferem proteção à membrana plasmática durante o congelamento / descongelamento por interações diretas com a membrana, as quais envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolipídeos (Yildiz *et al.*, 2000).

Geralmente os dissacarídeos são mais efetivos em estabilizar a bicamada da membrana que os monossacarídeos, mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibindo a fusão de membranas e mantendo lipídeos numa fase fluida na ausência de água (Anchordoguy *et al.*, 1987; Crowe *et al.*, 1987; De Leeuw *et al.*, 1993).

A rafinose (galactose-frutose-glicose) tem sido o açúcar mais utilizado na criopreservação de sêmen de ratos, visando promover a hipertonicidade necessária à desidratação da célula antes do congelamento. A trealose (glicose-glicose) confere proteção pelo efeito osmótico e das interações específicas com os fosfolipídeos de membrana. Além disso, atua na reposição de água da interface membrana-solução e na interação direta com os grupos polares dos fosfolipídeos durante as fases de desidratação e congelamento (Storey *et al.*, 1998; Aisen *et al.*, 2002).

Em equinos, desde que proposto por Martin *et al.* (1979), a lactose é o açúcar mais utilizado em meios diluidores para congelamento. Também foram realizados testes com metilcelulose e rafinose associadas à acetamida, sendo que houve queda na motilidade progressiva e aumento de anormalidades morfológicas quando utilizado a combinação desses três compostos (Juliani & Henry, 2008).

## **2.3. Aditivos**

### **2.3.1. Emulsificantes**

A adição de substâncias com propriedades detergentes em diluentes a base de gema de ovo melhora a motilidade pós-descongelamento, integridade acrossomal e sobrevivência espermática.

O surfactante mais empregado para sêmen equino é o lauril trietanolamina sulfato de sódio, conhecido como orvus-es-paste (OEP) que é adicionado ao diluente em frações de 0,5 a 1,5% (Martin *et al.*, 1979; Holt, 2000).

O dodecil sulfato de sódio (SDS), detergente aniônico, pode ser também empregado com tal finalidade. Porém uma exposição prolongada dos espermatozoides ao SDS poderia conferir um excesso de fluidez à sua membrana plasmática, ocasionando um prejuízo à qualidade espermática (Peña & Linde-Forsberg, 2000).

Ambos têm propriedade emulsificante e aumentam a disponibilidade dos fosfolípidos da gema de ovo em diluidores, e acredita-se que sejam capazes de melhorar a interação destes com a superfície da membrana plasmática, o que explicaria os melhores resultados de motilidade e integridade acrossomal obtidos com sua utilização. Ainda, poderiam favorecer a formação de micro-cristais de gelo de formato angular durante o congelamento, minimizando os danos causados à membrana espermática (Johnson *et al.*, 2000).

### **2.3.2. EDTA**

A redução da temperatura tem como uma consequência aumento da permeabilidade da membrana, ocorrendo então influxo de íons cálcio para o meio intracelular. Este elemento é importante na capacitação espermática, na reação acrossômica e hiperativação da motilidade espermática, entretanto o influxo de íons cálcio prematuramente precipita esse momento, diminuindo a capacidade fertilizante das células espermáticas criopreservadas (criocapacitação).



Neste sentido se utiliza aditivos quelantes de cálcio com a finalidade de inibir ou minimizar o influxo de íons cálcio precocemente durante a criopreservação (Holt, 2000).

O quelante mais utilizado em meio diluidor de sêmen de equinos é o ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA), que possui propriedades de se ligar fortemente a íons metálicos bivalentes como o  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ , deixando-os indisponíveis no meio extracelular. Assim, não há influxo de íons e o início da capacitação espermática e da reação acrossômica é prevenido / retardado, mantendo os espermatozóides viáveis por mais tempo (Johnson *et al.*, 2000).

#### **2.4. Meios diluidores para sêmen equino**

Existe uma diversidade grande de diluidores que são utilizados para o congelamento de sêmen equino. Dentre eles, o diluidor proposto por Martin *et al.* (1979), formulado com lactose-EDTA-gema de ovo; o diluidor proposto por Kenney *et al.* (1975) acrescido de gema de ovo e glicerol (Burns, 1992; Burns & Reasner, 1995); o diluidor Naumienkov & Romankova (Tischner, 1979); o INRA 82, com várias concentrações de gema de ovo e glicerol (Palmer, 1984); e o Botu-crio (Botupharma, Botucatu, Brasil).

Outros meios de congelamento incluem o Cáceres, a base de leite desnatado com 1,5% de glicerol e 1,5% de dimetilformamida (Morillo Rodríguez *et al.*, 2011); meio Gent, à base de açúcares, leite, tampões, 5% de gema de ovo e 5% de glicerol; o INRA Freeze<sup>®</sup>, que é o meio INRA 96 acrescido de plasma de gema de ovo; o meio MP-50, constituído de gema de ovo, leite desnatado, Dulbeccos Basal Medium Eagle (BME) e uma associação de glicerol e dimetilformamida (Gomes *et al.*, 2002b; Papa *et al.*, 2002); o meio glicina gema de ovo (Papa *et al.*, 1993); e o meio BME-adaptado, formulado a partir de uma associação de meios: Merk-gema (33%), Kenney (31,7%) e Dulbeccos Basal Medium Eagle (31,7%, Neves Neto *et al.*, 1999).

## 2.5. Avaliação computadorizada da motilidade espermática

Uma vez realizado o congelamento, chegará o momento do seu descongelamento e avaliação. A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozóides é importante devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozóides (Arruda, 2000; Verstegen *et al.*, 2002; Matos *et al.*, 2008).

Em 1992, surgiu o HTM-IVOS Sperm Analyzer<sup>®</sup>, um sistema integrado de computador e microscópio que permitia a aquisição de imagens digitalizadas, fornecendo classificação automática dos movimentos espermáticos, informando porcentagem de células móveis, média de velocidade e porcentagem de progressivos (Iguer-Ouada & Verstegen, 2001). Diversos sistemas de análises computadorizadas da motilidade espermática (Computer Assisted Sperm Analyses - CASA) têm sido propostos e aplicados na tentativa de minimizar os efeitos negativos da avaliação convencional do sêmen (Malmgren, 1997; Tardif *et al.*, 1997; Verstegen *et al.*, 2002; Amann & Katz, 2004; Matos *et al.*, 2008).

Segundo Amann e Katz (2004), CASA refere-se a um sistema automatizado (*Hardware e Software*) para visualizar e digitalizar imagens sucessivas dos espermatozóides, processando, analisando e fornecendo informações acuradas, precisas e significativas da cinética individual das células, e também valores estatísticos médios sumarizados da população global.

Os espermatozóides móveis observados são identificados em imagens sucessivas, que permitem estabelecer suas trajetórias. Finalmente as trajetórias obtidas são matematicamente processadas permitindo a definição dessas trajetórias de forma numérica. Os resultados desses processamentos são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozóide.

Os equipamentos utilizados no sistema CASA variam largamente no que diz respeito às máquinas, ópticas e *softwares* usados (Verstegen *et al.*, 2002). Atualmente vários sistemas de análises computadorizadas das células espermáticas (CASA) estão disponíveis comercialmente, como: Hamilton Thorn

(Hamilton Thorn Research, Beverly, USA); IMAGESP® (Vimas IMAGESP®, Barcelona, Espanha); Hobson Sperm Tracker (Hobson Tracking Systems Ltda., Sheffield, Inglaterra), Sperm Class Analyzer® (Microptic SL, Barcelona, Espanha), SM-CMATM (MTM Medical Technologies, Montreaux, Switzerland), QualiSperm™, 1.3 (Biophos, Pfäffikon, Switzerland), entre outros.

Os parâmetros gerados da motilidade espermática pelo sistema são: Motilidade Total (MT, %), referente à população de células que estão se movendo com uma velocidade mínima determinada no *setup*; Motilidade Progressiva (MP, %), referente à porcentagem de células movendo-se progressivamente; Velocidade de Trajeto (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), é a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; Velocidade Progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), é a velocidade média percorrida em linha reta entre o ponto inicial e final do trajeto; Velocidade Curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula; Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ), é a largura média da oscilação da cabeça conforme a célula se move; Frequência de Batimentos (BCF, Hz), é a frequência com que a cabeça do espermatozóide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido; Retilinearidade (STR, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VAP; Linearidade (LIN, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VCL; e Velocidade Rápida (%; Arruda, 2000).

Ainda não está bem claro qual das características do movimento espermático determinada pelo sistema CASA é capaz de prever a fertilidade. Apesar da grande controvérsia existente a respeito da correlação dos padrões de movimento espermático com os índices de fertilidade *in vivo*, são observadas diferenças no padrão de movimento desempenhado por espermatozoides que alcançam altas e baixas taxas de fertilização. Nesse sentido, algumas variáveis geradas pela técnica CASA, como a linearidade espermática, parecem apresentar maior correlação com fertilidade. Ainda, a associação de múltiplas variáveis de movimento geradas pela técnica CASA mostra maior correlação com fertilidade *in vivo* em relação à utilização de apenas uma característica de movimento (Farrel *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999; Verstegen *et al.*, 2002; Matos *et al.*, 2008).

O grande desafio para se trabalhar com o sistema CASA é padronizar os procedimentos laboratoriais adotados para a análise objetiva do sêmen. É fundamental manter a concentração espermática baixa (entre 5 e 50 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL) no momento da avaliação; utilizar meios diluidores que não interfiram nas avaliações (como por exemplo tampão fosfato PBS, meios Talp, MW - Modified Whitten's Medium, dentre outros) e causem diminuição da motilidade, seja por depressão do sistema gerador de ATP da célula, ou por formação de debris (diluentes contendo gema de ovo não são recomendados nestes casos, por exemplo).

Quando existem partículas de tamanho semelhante ao da cabeça dos espermatozoides, o sistema reconhece essas partículas como uma célula imóvel, subestimando, com isso, a motilidade. Com o uso da ferramenta IDENT contida em alguns aparelhos é possível reduzir erros de contagem do sistema para menos de 2%. O sistema IDENT baseia-se no uso de sonda fluorescente (Hoeschst 33342), que cora DNA das células. Dessa forma somente células emitindo uma quantidade previamente padronizada de absorvância são reconhecidas pelo aparelho, eliminando da contagem de possíveis debris (Arruda *et al.*, 2011).

## **2.6. Fertilidade do sêmen congelado equino**

Existe uma grande variação na metodologia de congelamento do sêmen equino (meios diluidores, crioprotetores utilizados, concentração do sêmen envasado, curvas de resfriamento, congelamento e descongelamento), e isto se reflete nas taxas de prenhez das éguas inseminadas.

Outro fator responsável pelas taxas de prenhez alcançadas é a própria inseminação artificial, no que diz respeito à dose inseminante, ao volume depositado, ao local e técnica para deposição do sêmen e momento da inseminação (intervalo ovulação-inseminação ou inseminação-ovulação).

A dose inseminante geralmente varia de 5 a 800 milhões de espermatozoides dependendo do tipo de sêmen (sexado ou não; ou de baixa, média ou ótima qualidade) e técnica para deposição.

O volume inseminante pode variar de 250 $\mu$ L (palheta de 0,25 mL) até quantidades maiores, quando se acrescenta algum diluidor ao sêmen após descongelamento, o que vem sendo bastante pesquisado e parece melhorar as taxas de fertilidade pós-descongelamento.

Quanto à técnica e local de deposição, o sêmen pode ser depositado no corpo uterino, no corno uterino, no ápice do corno uterino ou na junção útero-tubárica (JUT, com auxílio de endoscópio). O desenvolvimento do método de inseminação histeroscópica em éguas com baixo número de espermatozóides se mostra interessante quando se tem poucas doses de um garanhão já falecido, por exemplo. Porém alguns trabalhos mostram similaridade entre inseminações com utilização de pipeta flexível no ápice do corno e endoscópio na JUT, quando se utiliza doses maiores (Lindsey *et al.*, 2002ab).

Quanto ao momento da inseminação, esta pode ser realizada após a ovulação, ou antes, da ovulação da égua. Um trabalho publicado em 2011 (Newcombe *et al.*, 2011), envolvendo 867 inseminações realizadas em éguas com sêmen equino congelado pós-ovulação, chegou à conclusão que reduzir o intervalo de controle folicular para menos de 12 horas não aumenta a taxa de gestação. Os autores não obtiveram diferença quando o intervalo controle-inseminação variou de 0-3 (43,2%, n=44), 3-6 (44,7%, n=150), 6-9 (45,1%, n=432), 9-12 (55,8%, n=190) e 12-15 horas (54,9%, n=51).

Visto que o sêmen congelado é invariavelmente caro e muitas vezes vendido em doses, só se pode garantir que o sêmen não será desperdiçado quando a inseminação for realizada após detecção da ovulação. Porém existem protocolos de inseminação pré-ovulação que exigem administração de um indutor de ovulação (hCG e deslorelina são os mais utilizados), que garante cerca de 95% de éguas ovulando. Nesses protocolos geralmente se faz uma inseminação 24-36 horas após a administração do indutor e uma segunda inseminação se necessário (40 horas após aplicação do indutor).

## 2.7. Colesterol e a membrana plasmática

Para desempenhar suas funções a membrana plasmática deve se apresentar em estado de fluidez, sendo este estado afetado principalmente pela composição relativa entre o colesterol e os fosfolipídeos, e pela temperatura à qual a membrana é exposta.

Trabalhando com bactérias, Rottem *et al.* (1973) observaram que aquelas que possuíam baixo teor de colesterol nas membranas celulares apresentavam pequena tolerância a baixas temperaturas. A partir daí, a quantidade de colesterol nas membranas dos espermatozóides passou a ser relacionada com a susceptibilidade desta célula ao choque térmico (White, 1993).

Atualmente a relação entre os níveis de colesterol da membrana plasmática dos espermatozóides e esta susceptibilidade está bem estabelecida. Espécies que possuem altas proporções de colesterol em relação aos fosfolipídeos, a exemplo dos humanos e coelhos (0,99 e 0,88, respectivamente;), são mais resistentes ao choque térmico. Por outro lado, espécies com menor proporção de colesterol, como suínos (0,26) e equinos (0,36), são menos resistentes (Watson, 1981; Cross, 1998; Meseguer *et al.*, 2004; Mocé & Graham, 2006).

O colesterol tem múltiplos efeitos nas membranas, incluindo sua estabilização; redução da sua permeabilidade; melhoria de suas características morfológicas e possibilidade de interações célula-célula, influenciando na fase de transição da membrana, fornecendo microambiente adequado para as proteínas integrais e periféricas da membrana e servindo como antioxidante (Crockett, 1998).

A remoção deste lipídeo da membrana promove desestabilização da mesma devido à reorganização dos componentes da bicamada, incluindo redistribuição de proteínas integrais, com aumento da capacidade de fusão e permeabilidade da membrana (Amann & Graham, 1993; Cross, 1998; Gadella *et al.*, 2001).

Ainda, quando o espermatozóide perde colesterol, pode sofrer uma capacitação prematura, reduzindo sua viabilidade nos órgãos reprodutivos da fêmea (Watson, 1995). Perdas de colesterol da membrana plasmática de células

criopreservadas têm sido observadas em suínos (50%) e garanhões (28%, Cerolini *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2005a). Uma maior concentração de colesterol na membrana pode impedir que as células sofram capacitação precoce, aumentando a sua viabilidade após a criopreservação.

Quinn & White (1967), trabalhando com espermatozóides de caprinos, concluíram que aquelas células espermáticas oriundas do testículo e da cabeça do epidídimo são pouco afetadas pelo choque térmico, enquanto aquelas da cauda do epidídimo e da ampola são muito mais susceptíveis. Isso pode ser explicado pela perda de fosfolipídeos e de colesterol pelo espermatozóide durante o trajeto pelos órgãos reprodutivos do macho.

### **2.7.1. Incorporação de colesterol à membrana plasmática**

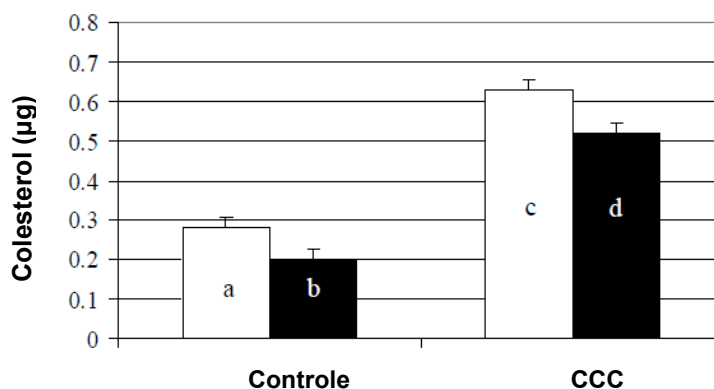
Uma maneira de incorporar o colesterol à membrana dos espermatozóides é por meio do complexo de inclusão com ciclodextrinas (Purdy & Graham, 2004a). Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, compostos de unidades glicosídicas, que possuem uma face externa hidrofílica e um núcleo interno hidrofóbico (Dobziuk, 2006), sendo este capaz de encapsular compostos hidrofóbicos, como o colesterol e outros lipídeos (Challa *et al.*, 2005).

O tratamento do sêmen com metil- $\beta$ -ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) mantém maior o percentual de espermatozóides móveis e viáveis após a criopreservação quando comparado a células não tratadas ou tratadas com outros tipos de ciclodextrinas ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -hidrato,  $\beta$ ,  $\beta$ -hidrato) (Combes *et al.*, 2000; Graham, 1998; Purdy & Graham, 2004a).

Ciclodextrinas podem ser carregadas com colesterol adicionando as duas substâncias em um diluente aquoso e procedendo a sonicação (Zeng & Terada, 2000; Galantino-Homer *et al.*, 2006; Movassaghi *et al.*, 2009) ou pela diluição destes numa mistura de metanol : clorofórmio seguida de secagem para obtenção de cristais (Purdy & Graham, 2004a).

Quando carregadas com colesterol, as ciclodextrinas o transferem para a membrana plasmática de vários tipos de células que têm seu gradiente de concentração baixo, incluindo o espermatozóide, o que resulta num aumento das concentrações de colesterol na membrana tanto de células a fresco como após criopreservação (Klein *et al.*, 1995; Christian *et al.*, 1997; Purdy & Graham, 2004a; Moore *et al.*, 2005a) (Figura 1).

O tratamento dos espermatozoides com CCC aumenta o conteúdo de colesterol de 2 a 3 vezes em bovinos, trutas, caprinos e garanhões, e este colesterol adicional aumenta a relação colesterol:fosfolípidos da membrana desses espermatozoides para taxas similares a de espécies não sensíveis ou menos sensíveis ao choque pelo frio ( $> 0,80$ ). Portanto, o tratamento com CCC pode minimizar os danos sofridos pelas células espermáticas durante a queda de temperatura na criopreservação (Purdy & Graham, 2004a; Moore *et al.*, 2005a; Müller *et al.*, 2008; Mocé *et al.*, 2010a).



**Figura 1:** Concentração de colesterol ( $\mu\text{g}/10^6$  espermatozoides) na membrana plasmática de células tratadas com 0 ou 1,5 mg de CCC/ $120 \times 10^6$  espermatozoides. A concentração foi determinada antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) o congelamento ( $n=14$ ). <sup>a,b,c,d</sup> Letras diferentes denotam diferenças entre tratamentos ( $p<0,05$ ). (Fonte: Moore *et al.*, 2005a).

Estudos recentes têm demonstrado efeitos benéficos da utilização do complexo metil- $\beta$ -ciclodextrina carregada com colesterol na criopreservação de sêmen de asininos, equinos, caprinos, bovinos, suínos, ovinos, camundongos e coelhos com melhora nos parâmetros de motilidade, viabilidade espermática e reação acrossômica (Combes *et al.*, 2000; Barrera-Compean *et al.*, 2005; Mao *et*



*al.*, 2005; Mocé & Graham, 2006; Galantino-Hommer *et al.*, 2006; Amorim *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2014; Moraes *et al.*, 2015).

### **2.7.2. Efeito do tratamento com colesterol na qualidade do sêmen descongelado**

De forma geral, o tratamento com CCC antes do congelamento de sêmen aumenta a motilidade total e/ou integridade de membrana. Esse benefício pode ser em pequena escala, com melhoria em poucos pontos percentuais, ou considerável, em torno de 25%. A maioria dos estudos reporta taxas de aumento de 10 a 20% (Tabela 1). No entanto, o benefício do tratamento com CCC varia para espermatozóides de diferentes espécies, diferentes linhagens dentro de uma mesma espécie, de indivíduo para indivíduo e espermatozóides tratados de diferentes maneiras.

Tem se notado que o tratamento com CCC beneficia o sêmen de espécies cujos espermatozóides são sensíveis ao choque pelo frio, mas o mesmo não parece ter nenhum efeito em espécies cujos espermatozóides não são sensíveis ao choque pelo frio, como coelho e truta arco-íris. Esta falta de benefício pode ser esperada, pois o coelho, por exemplo, já apresenta naturalmente uma alta relação colesterol:fosfolipídeos (0,88), sendo improvável que o tratamento com CCC possa aumentar o teor de colesterol dos espermatozóides.

Além da diferença na forma como os espermatozóides de diferentes espécies são afetadas pelo tratamento com CCC, há também uma variação entre indivíduos e linhagens dentro de uma mesma espécie. Por exemplo, os espermatozóides de garanhões que normalmente não congelam bem (classificados como "maus congeladores") se beneficiam mais quando tratados com CCC que espermatozóides de garanhões que normalmente congelam bem ("bons congeladores"; Moore *et al.* 2005a).

É importante ressaltar que os efeitos benéficos observados após criopreservação são devidos ao aumento do teor de colesterol celular e não às ciclodextrinas por si só, visto que, espermatozóides de carneiro tratados apenas

com ciclodextrinas antes da criopreservação (com intuito de remover o colesterol das células) tendem a ter taxas de sobrevivência baixas após descongelamento (Mocé *et al.*, 2010a).

Por outro lado, os espermatozóides de coelho e truta arco-íris tratados apenas com ciclodextrina apresentaram taxas semelhantes de sobrevivência aos não tratados, após descongelamento (Mocé & Graham, 2005; Müller *et al.*, 2008) (Tabela 1). Isso pode ser devido à retirada de colesterol da membrana espermática destas espécies não ser tão intensa ao ponto de prejudicar a habilidade da célula em resistir ao choque pelo frio.

Oliveira *et al.* (2014), trabalhando com diferentes teores de incorporação de CCC ao sêmen de jumentos Pêga antes da criopreservação (0 mg, 1 mg, 2 mg, e 3 mg), chegaram à conclusão de que todos os tratamentos foram superiores ao sêmen não tratado após as avaliações *in vitro* (teste com IP/FITC-PNA, motilidade computadorizada, HOST, morfologia espermática e supravital).

Como dito anteriormente, durante a criopreservação as células são primeiro, expostas a soluções hiperosmóticas contendo crioprotetores, o que provoca entrada inicial de água intracelular, seguida de um influxo de crioprotetores permeantes e água, levando a um posterior equilíbrio. A tolerância osmótica observada no sêmen tratado com colesterol indica que o espermatozóide, possivelmente, pode ser mais resistente ao dano da membrana durante a criopreservação.

**Tabela 1:** Concentrações de colesterol utilizadas para tratamento de espermatozóides e qualidade espermática observada após descongelamento para algumas espécies.

Espécies	Autores	Concentração	Motilidade total (%)		Integridade membrana (%)	
			Contr.	+ Col.	Contr.	+ Col.
<b>Bovino</b>	Purdy & Graham (2004a)	1,5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	42	60	46	55
	Purdy <i>et al.</i> (2005)	1,5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	-	-	60	76
	Mocé & Graham (2006)	2 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	58	58	45	62
	Amorim <i>et al.</i> (2009)	1,5 mg / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	40	54	30	50
	Moraes <i>et al.</i> (2010)	1,5 mg / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	32	56	-	-
<b>Equino</b>	Combes <i>et al.</i> (2000)	0,125 mmol colesterol / L	43-52	63-67	36-40	53-61
	Zahn <i>et al.</i> (2002)	0,125 mM	69	67	44	49
	Moore <i>et al.</i> (2005a)	1,5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	62	72	47	56
	Spizziri <i>et al.</i> (2010a)	1,5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	37	51	-	-
	Oliveira <i>et al.</i> (2010)	1,5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	Motilidade similar		20	34
	Moraes <i>et al.</i> (2015)	1,5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	55	69	28	47
		0,75 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	55	68	28	46
<b>Asinino</b>	Álvarez <i>et al.</i> (2006)	2 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	30	45	23 (MIAI)	31 (MIAI)
	Oliveira <i>et al.</i> (2014)	1 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	64	75	18 (MIAI)	34 (MIAI)
		2 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	64	80	18 (MIAI)	32 (MIAI)
		3 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	64	81	18 (MIAI)	36 (MIAI)
		Rates (2011)	1 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	37	44	33
			51	53	50	53
<b>Ovino</b>	Barrera-Compean <i>et al.</i> (2005)	2,5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	42	52	53	57
	Tomás <i>et al.</i> (2009a)	1 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	42	48	40	49

<b>Caprino</b>	de Graaf <i>et al.</i> (2007)	1,8 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz sexados	80	70	-	-
	Mocé <i>et al.</i> (2010b)	2 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	28	45-46	24	45-47
	Purdy <i>et al.</i> (2010)	2 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	36	38	41	49
<b>Suíno</b>	Zeng & Terada (2000)	20 mM HBC+5 mM col. a 500 x 10 <sup>6</sup> sptz/mL	35	52	8	13
	Zeng & Terada (2001)	20 mM MBC+10 mM col. a 500 x 10 <sup>6</sup> sptz/ mL	31	31	-	-
	Torres <i>et al.</i> (2009)	1,5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	37	46	-	-
		1 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	57	63	-	-
<b>Camundongo</b>	Loomis & Graham (2008)	2 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	9-52	38-55	-	-
	Movassaghi <i>et al.</i> (2009)	1–2 mg CCC sonicada / mL de sêmen	29	66-71	-	-
<b>Coelho</b>	Mocé & Graham (2005)	5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	14	17	33	31
<b>Truta</b>	Müller <i>et al.</i> (2008)	0,4 µmol col. (5 µmol MBC / 10 <sup>9</sup> sptz)	3-15	3-15	-	-

Contr.:sêmen sem tratamento. + Col.: sêmen tratado com ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) antes do congelamento. MIAI: membrana plasmática íntegra e acrossomo íntegro. HBC: 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina. MBC: metil-β-ciclodextrina. Sptz: espermatozóides. (Adaptado de Mocé *et al.*, 2010a).

## 2.8. Colesterol e fosfolipídeos insaturados na capacitação espermática e fertilidade do sêmen criopreservado

De modo geral, o conteúdo de lipídeos em espermatozóides maduros é de aproximadamente 6 a 7%, e os fosfolipídeos representam aproximadamente 60% desse total (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomiéline). O colesterol é o segundo principal componente da membrana plasmática e ocorre principalmente nas formas não esterificadas. Os fosfolipídeos são as principais fontes de substrato energético, a partir da oxidação intracelular, para respiração do espermatozóide (Mann, 1964; Scott, 1973).

Veenheuvel (1971) citado por Scott (1973) observou que o aumento na proporção de ácidos graxos poliinsaturados no espermatozóide, durante a maturação no epidídimo, melhorou as propriedades físicas e químicas da membrana celular. Por outro lado, os fosfolipídeos e ésteres de colesterol com alta proporção de ácidos graxos saturados tendem a ser mais rígidos ou menos fluidos que os componentes de membrana similares com elevadas proporções de poliinsaturados (McDowell, 1989).

Sendo assim, a fluidez da membrana é modulada pelo nível de colesterol, grau de insaturação da cadeia acil dos fosfolipídeos, composição dos fosfolipídeos e pelas proteínas de membrana (Darin-Bennett & White, 1977). Portanto, a adaptação da membrana aos efeitos danosos do congelamento e descongelamento é melhor nos espermatozóides com elevada fluidez de membrana (Giraud *et al.*, 2001).

Lipídeos como o colesterol (Zahn *et al.*, 2002; Purdy & Graham, 2004b; Moore *et al.*, 2005a), colestanol (Amorim *et al.*, 2007) e desmosterol (Nimmo & Cross, 2003; Moce & Graham, 2006; Amorim *et al.*, 2008), e ácidos graxos poliinsaturados (Paulenz *et al.*, 1999; Cerolini *et al.*, 2001; Mitre *et al.*, 2004) foram testados, apresentando benefícios na manutenção da viabilidade e *status* de acrossoma dos espermatozóides criopreservados.

Durante o processo de capacitação espermática ocorrem várias alterações nos componentes da membrana, que podem ser modificados ou removidos por secreções dos órgãos reprodutivos femininos, provocando a desestabilização da

bicamada lipídica. Dentre essas alterações estão a perda de proteínas ou redução de seu peso molecular, redução da proporção de colesterol:fosfolípideo pela perda de colesterol e aumento da mobilidade lateral de lipídeos e proteínas, o que permite abertura dos canais de cálcio (importante para o início do processo de capacitação) e fusão da membrana plasmática com a membrana acrossômica externa, iniciando-se a reação acrossômica (Amann & Graham, 1993; Delpech & Thibault, 1993; Bazer *et al.*, 1995; Gadella *et al.*, 2001).

O efluxo de colesterol ocorre devido sua transferência para albuminas e lipoproteínas de alta densidade da tuba uterina e desestabiliza a membrana, promovendo a reorganização dos componentes da bicamada como redistribuição de proteínas integrais.

Com relação à incorporação de colesterol, alguns autores relataram que tratamento com CCC tem a habilidade de atrasar a capacidade de sofrer reação acrossômica de espermatozóides humanos (Khorasani *et al.*, 2000), equinos (Zahn *et al.*, 2002; Spizziri *et al.*, 2010b), bovinos (Purdy & Graham, 2004a) e de coelhos (Aksoy *et al.*, 2010), o que pode garantir células viáveis por um período maior de tempo nos órgãos reprodutivos femininos.

Segundo Spizziri *et al.* (2010b), espermatozóides equinos tratados com CCC mantêm os níveis de colesterol elevados mesmo após o tratamento para induzir a capacitação, obtiveram, ainda em 2010 (Spizziri *et al.*, 2010a), taxas de prenhez de 15% (3/20) para o sêmen tratado (1,5 mg de CCC/120 x 10<sup>6</sup> de espermatozóides) e 28,6% (6/21) para o sêmen sem adição de CCC com inseminações realizadas 30 horas após indução da ovulação com hCG. No mesmo sentido, também trabalhando com equinos, Zahn *et al.* (2002) obtiveram taxas de gestação de 25% (3/12) e 75% (9/12) em inseminações com sêmen tratado com CCC e sem adição de colesterol, respectivamente, em inseminações pós-ovulação.

Como o tratamento com CCC aumenta o teor de colesterol da membrana espermática, o processo de capacitação de células tratadas como um todo leva um tempo maior para ocorrer. Em se tratando da inseminação pós-ovulação (protocolo mais utilizado para inseminação em éguas com sêmen congelado de

garanhões), este fato parece ser prejudicial, visto que, os espermatozóides levam um tempo maior para se tornarem capazes de fertilizar o ovócito já presente na tuba uterina da fêmea, sendo que quando as células espermáticas se tornassem capacitadas à fertilização o ovócito poderia já não se encontrar mais viável.

Discute-se entre os pesquisadores a maneira como se deve testar a eficiência da adição de colesterol à membrana plasmática. Moore *et al.* (2005a), utilizando mesmo número de espermatozóides totais para realizar o ensaio (fixando-se o número de palhetas e favorecendo aquele tratamento com melhor motilidade e viabilidade), relataram que os espermatozóides de equinos tratados com CCC apresentaram maior capacidade fecundante. O mesmo resultado foi encontrado por Tomás *et al.* (2009ab) quando a motilidade e viabilidade foram semelhantes entre o grupo tratado ou não para realização dos ensaios com sêmen de caprino.

Outros estudos, porém, relatam taxas similares de fertilização *in vitro* (Purdy & Graham, 2004b) e ligação à zona pelúcida (Spizziri *et al.*, 2010a) para espermatozóides tratados e não tratados, quando mesmo número de espermatozóides móveis foi utilizado no ensaio para ambos os grupos.

Na Tabela 2 está sumarizada a capacidade de fertilização dos espermatozóides tratados com CCC quando utilizados ensaios *in vitro*. Na maioria dos estudos, os espermatozóides tratados com CCC apresentaram maior taxa de penetração de ovócitos e/ou maior número de espermatozóides ligados à zona pelúcida ou membranas perivitelinas da gema de ovo.

Resultados para testes de fertilidade *in vivo* estão resumidos na Tabela 3. Embora a qualidade do sêmen em geral seja melhor para os espermatozóides tratados com CCC após a criopreservação, isto não tem se traduzido em uma maior capacidade de fertilização *in vivo*. Embora taxas de fertilidade mais baixas de espermatozóides tratados com CCC em relação ao controle tenham sido relatadas em garanhões (Zahn *et al.*, 2002), na maioria dos estudos o sêmen tratado com CCC e o controle têm mostrado taxas de fertilidade semelhantes.

**Tabela 2:** Efeito da ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) na fertilidade *in vitro*.

Espécies	Teste	Parâmetro Avaliado	Controle	Tratado CCC	Tratado Ciclo
<b>Bovino</b> <sup>ab</sup>	MPVGO	Nº sptz ligados/MPVGO	62 <sup>a</sup>	115 <sup>a</sup>	-
			85 <sup>b</sup>	157 <sup>b</sup>	-
<b>Bovino</b> <sup>c</sup>	FIV-bov	Clivagem	48%	46%	-
		Blastocistos/ovócito clivado	25%	26%	-
<b>Equino</b> <sup>de</sup>	ELZP-bov	Nº sptz ligados/ZP	15 <sup>d</sup>	48 <sup>d</sup>	-
			13,4 <sup>e</sup>	21 <sup>e</sup>	-
		Nº sptz ligados à ZP/ motilidade espermática	0,23 <sup>d</sup>	0,64 <sup>d</sup>	-
			13,4 <sup>e</sup>	21 <sup>e</sup>	-
<b>Equino</b> <sup>f</sup>	MPVGO	Nº sptz ligados/MPVGO	61	110	-
<b>Caprino</b> <sup>g</sup>	ELZP-bov	Nº sptz ligados/ZPb	4,6	12	-
	ELZP-ovi	Nº sptz ligados/ZPo	9,3	27,3	-
<b>Suíno</b> <sup>h</sup>	FIV-suíno	Taxa de penetração	1,8%	-	46,3%
<b>Suíno</b> <sup>i</sup>	EPE-suíno	Ovócitos penetrados	51,47%	69,27%	52,66%
		Nº sptz/ovócito penetrado	3,35	4,97	3,66

Controle: sêmen sem adição de colesterol; Tratado CCC: sêmen tratado com ciclodextrina carregada com colesterol; Tratado Ciclo: espermatozóides tratados com ciclodextrina; MPVGO: membrana perivitelínica da gema de ovo de galinha; FIV-bov: fertilização *in vitro* de ovócitos bovinos maturados *in vitro*; ELZP-bov: ensaio de ligação à zona pelúcida de ovócitos bovinos imaturos; ELZP-ovi: ensaio de ligação à zona pelúcida de ovócitos ovinos imaturos; ZPb: zona pelúcida bovina; ZPo: zona pelúcida ovina; FIV-suíno: fertilização *in vitro* de ovócitos suínos maturados *in vitro*; EPE-suíno: ensaio de penetração espermática em ovócitos imaturos de suínos. Sptz: espermatozóides.

<sup>a</sup> Amorim *et al.* (2009); <sup>b</sup> Moraes *et al.* (2010); <sup>c</sup> Purdy & Graham (2004b); <sup>d</sup> Moore *et al.* (2005a); <sup>e</sup> Spizziri *et al.* (2010a); <sup>f</sup> Moraes *et al.* (2015); <sup>g</sup> Mocé *et al.* (2010b); <sup>h</sup> Mao *et al.* (2005); <sup>i</sup> Tomás *et al.* (2009b). (Adaptado de Mocé *et al.*, 2010a).



**Tabela 3:** Efeito do tratamento do sêmen com CCC sobre a fertilidade dos espermatozoides *in vivo*.

Espécies	Dose Inseminate	Controle	Tratado CCC	Tratado Ciclo
<b>Bovino</b> <sup>a</sup>	750.000 sptz totais/IA	50% (16/32)	59% (19/32)	-
<b>Equino</b> <sup>b</sup>	800 x 10 <sup>6</sup> sptz móveis/IA	75% (9/12)	25% (3/12)	-
<b>Equino</b> <sup>c</sup>	400 x 10 <sup>6</sup> sptz totais/IA	28,6% (6/21)	15% (3/20)	-
<b>Truta</b> <sup>d</sup>	1 x 10 <sup>9</sup> sptz/200 ovos	>40%	>40%	≈ 20%
<b>Caprino</b> <sup>e</sup>	100 x 10 <sup>6</sup> sptz totais/IA	45,3% (13/29)	41% (15/36)	-
<b>Asinino</b> <sup>f</sup>	300 x 10 <sup>6</sup> sptz móveis/IA	10% (3/30)	3,3% (1/30)	-
<b>Asinino</b> <sup>g</sup>	300 x 10 <sup>6</sup> sptz móveis/IA	6,25% (1/15)	-	58,5% (14/24)

Controle: sêmen sem adição de colesterol; Tratado CCC: sêmen tratado com ciclodextrina carregada com colesterol; Tratado Ciclo: espermatozoides tratados com ciclodextrina. Sptz: espermatozoides.

<sup>a</sup> Purdy & Graham (2004b); <sup>b</sup> Zahn *et al.* (2002); <sup>c</sup> Spizziri *et al.* (2010a); <sup>d</sup> Müller *et al.* (2008); <sup>e</sup> Purdy *et al.* (2010); <sup>f</sup> Oliveira *et al.* (2014); <sup>g</sup> Jepsen *et al.* (2010). (Adaptado de Mocé *et al.*, 2010a).

### 3. CAPÍTULO 1

## FONTES DE ÓLEOS PARA MODIFICAR A COMPOSIÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES EQUINOS E MELHORAR SUA MOTILIDADE APÓS CRIOPRESERVAÇÃO

### 3.1. Introdução

Diferença na composição lipídica da membrana plasmática do espermatozóide é um fator chave na habilidade de criopreservação desta célula. Em espécies mamíferas até 60% dos ácidos graxos totais são poliinsaturados de cadeia longa da série n-3, sendo o mais abundante o ácido docosahexaenóico (DHA; C22:6, n-3). Esta composição lipídica específica confere fluidez e flexibilidade à membrana devido à presença de ligações duplas, que dá às membranas uma resistência melhor aos danos causados pela criopreservação, melhora a mobilidade da cauda do espermatozóide e garante eventos relacionados à fusão, envolvidos na fertilização (Poulos *et al.*, 1973; Bwanga, 1991; Lenzi *et al.*, 1996; Flesch & Gadella, 2000; Maldjian *et al.*, 2005; Tavalani *et al.*, 2007).

A concentração do ácido docosahexaenóico no plasma seminal e na membrana espermática pode ser associada positivamente com motilidade espermática em seres humanos, tendo espermatozóides de homens astenozoospermicos níveis inferiores de DHA quando comparado com células espermáticas de homens normozoospermicos (Poulos *et al.*, 1973).

Quanto à capacidade de criopreservação, espermatozóides coletados de elefantes africanos (*Loxodontia africana*) tiveram níveis mais elevados de ácidos docosahexaenóico e docosapentaenóico (DPA; C22:5, n-3 e n-6), se comparados aos coletados de elefantes asiáticos (*Elephas maximus*). Conhecidamente, o sêmen de elefantes africanos pode ser congelado com protocolos que não apresentam resultados satisfatórios em elefantes asiáticos (Swain & Miller, 2000).

Os ácidos graxos de cadeia longa eicosapentaenóico (EPA; C20:5, n-3), docosapentaenóico (DPA; C22:5, n-3) e docosahexaenóico (DHA; C22:6, n-3) são especificamente abundantes em fontes naturais como peixes, sendo seus teores influenciados pela espécie (espécies de águas frias, salmão e bacalhau, por exemplo, alimentam-se de zooplâncton rico em n-3), estado fisiológico e época da pesca (Nettleton, 1991; Briz, 1997).

Outros ácidos graxos como o  $\alpha$ -linolênico (ALA; C18:3, n-3), linoleico (LA; C18:2, n-6) e oleico (OA; C18:1, n-9) são encontrados em abundância em óleos vegetais, como óleos de semente de linho (*Linum usitatissimum*) e de açafrão-bastardo (*Carthamus tinctorius*). Os ácidos graxos  $\alpha$ -linolênico e linoleico são considerados essenciais por não serem sintetizados no organismo animal (McDowell, 1989).

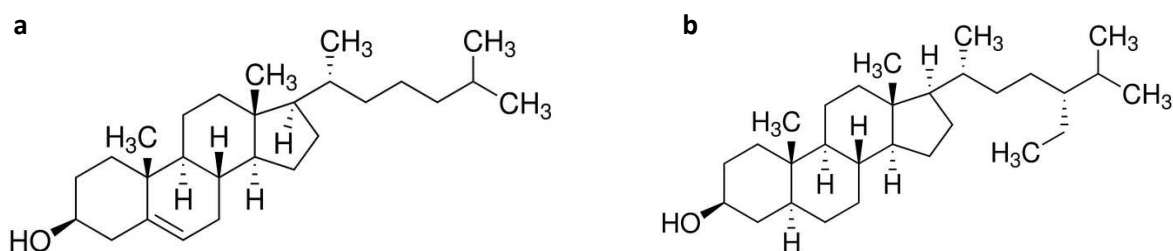
A adição de alguns desses lipídeos parece ser benéfica ao espermatozóide, conferindo maior proteção durante o processo de criopreservação. A melhora na congelabilidade pode ser observada com a adição do composto ácido oleico-linoleico, o que confere maior motilidade e viabilidade após descongelamento do sêmen de carneiros (Pérez-Pé *et al.*, 2001; Marti *et al.*, 2008). Ainda, a adição de ácido linoleico ao diluidor de congelamento de bovinos proporcionou uma melhora das variáveis seminais após a incubação por 30 horas a 4 °C (Takahashi *et al.*, 2012).

O colesterol presente na membrana espermática tem múltiplos efeitos nesta, incluindo sua estabilização, redução da sua permeabilidade, melhoria de suas características morfológicas e possibilidade de interações célula-célula, influenciando na fase de transição da membrana, fornecendo microambiente adequado (químico e/ou físico) para as proteínas integrais e periféricas da membrana e servindo como antioxidante (Crockett, 1998).

A adição de colesterol ao diluidor seminal aumenta a proporção colesterol:fosfolípídeo bem como a tolerância osmótica, conferindo maior permeabilidade aos crioprotetores e aumento da longevidade do espermatozóide. A adição de um análogo vegetal do colesterol ( $\beta$ -sitosterol) mostrou efeitos

similares ao do colesterol na inibição da reação acrossômica induzida em espermatozóides humanos (Khorasani *et al.*, 2000; Mocé *et al.*, 2010a).

Os fitoesteróis, que compreendem esteróis e estanois, são compostos semelhantes ao colesterol, encontrados em vegetais, que variam apenas em cadeias laterais de carbono e/ou presença ou ausência de dupla ligação. Os estanois são saturados, não apresentando dupla ligação na estrutura do anel esterol. Mais de 200 esteróis e compostos relacionados foram identificados. Fitoesteróis livres extraídos a partir de óleos são insolúveis em água, relativamente solúveis em óleos e solúveis em álcoois (Akhisa & Kokke, 1991). O estigmastanol (sitostanol) é um exemplo de fitosterol encontrado em vários vegetais (Figura 2).



**Figura 2:** Fórmula estrutural do colesterol (a) e do estigmastanol (b). (Fonte: Sigma-Aldrich®)

### 3.2. Experimento 1: Utilização de diferentes fontes de lipídeos incorporados à metil- $\beta$ -ciclodextrina para melhorar motilidade de células espermáticas criopreservadas.

#### 3.2.1. Objetivo

- Avaliar efeito do colesterol, estigmastanol, óleo de salmão e óleo de semente de linho carregados por metil- $\beta$ -ciclodextrina na motilidade do sêmen após descongelamento.

### **3.2.2. Material e métodos**

#### **3.2.2.1. Incorporação à metil- $\beta$ -ciclodextrina**

Para incorporar colesterol (C8667, 5g / Sigma) e estigmastanol (S4297, 1g / Sigma) à metil- $\beta$ -ciclodextrina (C4555, 10g / Sigma), 200 mg de cada composto foram adicionados a 1 mL de clorofórmio (4440-08, 4L / Mallinckrodt Chemicals) em um tubo de vidro (12 x 75 mm). Em outro tubo de vidro, 1g de metil- $\beta$ -ciclodextrina foi adicionada a 2 mL de metanol (A412-4, 4L / Fisher Scientific). Quatrocentos e cinquenta microlitros da primeira solução foram adicionados à segunda, e o tubo agitado em vortex até a solução ficar translúcida. A solução foi então colocada em uma placa de Petri de vidro para secagem em fluxo de nitrogênio por 24 horas. O conteúdo da placa foi então raspado com espátula e armazenado em tubos de plástico a cerca de 22 °C. A solução trabalho foi feita adicionando 50 mg do conteúdo desidratado a 1 mL de meio MW (Modified Whitten's Medium, Anexo 8.1) a 37 °C e agitando-a em vortex até completa dissolução. A solução foi mantida a 5 °C entre as utilizações, e sempre aquecida a 37 °C e agitada vigorosamente antes da adição ao sêmen.

Mesma metodologia foi utilizada para incorporar óleos de salmão (Cold Water Salmon Oil - 1000 mg, Nature's Bounty, Inc. Bohemia, NY – USA) e de semente de linho (Natural Cold Pressed Flaxseed oil - 1200 mg, Nature's Bounty, Inc. Bohemia, NY – USA) à metil- $\beta$ -ciclodextrina (C4555, 10g / Sigma). Porém apenas 120 mg destes foram dissolvidos em clorofórmio (e não 200 mg como no caso do colesterol e do estigmastanol).

#### **3.2.2.2. Coleta e preparação do sêmen**

Sêmen de cinco garanhões com idade entre 15 e 21 anos, das raças Puro-Sangue Inglês, Quarto de Milha e Árabe; estabulados no Laboratório de Reprodução Equina da Universidade Estadual do Colorado (CSU, Fort Collins-CO,

USA) foram utilizados neste estudo, estando os animais em regime de coleta rotineiro três vezes por semana, e mantidos sob diretrizes impostas pelo Comitê de Utilização e Cuidados dos Animais da CSU.

Os ejaculados foram coletados com vagina artificial modelo CSU (Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA). Uma pequena amostra foi diluída a  $50 \times 10^6$  de espermatozoides/mL em EZ-Mixin<sup>®</sup> Basic Formula Extender (Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA) e as motilidades total e progressiva foram determinadas utilizando CASA (Computer Assisted Sperm Analysis; IVOS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA). Ejaculados com motilidade total superior a 60% foram diluídos 1:1 em MW e transportados até o laboratório para processamento.

Passados no máximo 45 minutos após a coleta e diluição, o sêmen foi centrifugado a 400 g / 7,5 minutos em tubos cônicos de 15 mL e ressuspenso para concentração de  $120 \times 10^6$  espermatozoides / mL em MW, sendo 2 mL colocados em diferentes tubos de vidro (13 x 100 mm) e utilizados para cada um dos nove tratamentos:

- 1- CT: sêmen sem nenhum aditivo;
- 2- CCC: adição de 2 mg de ciclodextrina carregada com colesterol / mL de sêmen;
- 3- CCE: adição de 2 mg de ciclodextrina carregada com estigmastanol / mL de sêmen;
- 4- S1: adição de 1 mg de ciclodextrina carregada com óleo de salmão / mL de sêmen;
- 5- S2: adição de 2 mg de ciclodextrina carregada com óleo de salmão / mL de sêmen;
- 6- S3: adição de 3 mg de ciclodextrina carregada com óleo de salmão / mL de sêmen;
- 7- L1: adição de 1 mg de ciclodextrina carregada com óleo de semente de linho / mL de sêmen;
- 8- L2: adição de 2 mg de ciclodextrina carregada com óleo de semente de linho / mL de sêmen;

9- L3: adição de 3 mg de ciclodextrina carregada com óleo de semente de linho / mL de sêmen.

As amostras foram mantidas por 15 minutos a aproximadamente 22 °C e então diluídas a  $40 \times 10^6$  espermatozoides / mL em meio de congelamento Sacarose-EDTA (Anexo 8.4). Os tubos foram vedados com parafilme e inseridos em um becker de 150 mL contendo 100 mL de água nanopure a aproximadamente 22 °C.

O conjunto foi então mantido em sala refrigerada a 5 °C por 2 horas, de forma a permitir manutenção da temperatura durante o envase do sêmen em palhetas de 0,5 mL. O congelamento foi realizado no interior da sala refrigerada, em caixa de isopor, colocando-se as palhetas a 7 cm do nível do nitrogênio em rampa flutuante por 15 minutos (-60 °C/min; Cochran *et al.*, 1984; Cristanelli *et al.*, 1985; Pickett *et al.*, 1987), quando então foram imergidas em nitrogênio líquido para armazenamento nos botijões de nitrogênio até avaliação.

### **3.2.2.3. Análise da motilidade espermática**

Duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas a 37 °C por 30 segundos e seus conteúdos misturados em um tubo de vidro para avaliação da motilidade utilizando CASA (Computer Assisted Sperm Analysis; IVOS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA).

As características foram ajustadas da seguinte maneira no Animal Motility: 30 imagens adquiridas (image capture: nº of frames); 60 imagens / seg (image capture: frames per sec.); contraste mínimo da célula: 80 (cell detection: minimum contrast); tamanho mínimo da célula: 3 pixels (cell detection: minimum cell size); tamanho para células imóveis: 5 pixels (defaults: cell size); intensidade para células imóveis : 110 (defaults: cell intensity); referência de VAP para células progressivas: 50,0 µm/seg (progressive cells: path velocity – VAP); referência de STR para células progressivas: 75,0% (progressive cells: straightness – STR); referência de velocidade de trajeto - VAP para células lentas: 20,0 µm/seg (slow

cells: VAP cutoff); referência de velocidade progressiva - VSL para células lentas: 0  $\mu\text{m}/\text{seg}$  (slow cells: VSL cutoff).

Uma gota de 6,5  $\mu\text{L}$  do sêmen de cada tratamento foi colocada em uma lâmina para microscopia Cell-Vu (Millennium Sciences, Inc., New York) a 37 °C, e pelo menos 400 espermatozóides foram analisados por amostra.

#### **3.2.2.4. Análise estatística**

As variáveis-dependentes consideradas foram motilidade total e motilidade progressiva do sêmen após descongelamento. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA). Diferenças entre tratamentos foram checadas pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) com 5% de probabilidade de erro (Statistical Analysis Systems; Cary NC, USA).

#### **3.2.3. Resultados e discussão**

Não houve diferença entre os tratamentos no que se refere às motilidades total e progressiva dos espermatozóides após descongelamento ( $p > 0,05$ , Tabela 4). Não houve interação entre os fatores.

Nenhum dos tratamentos realizados aqui se mostrou capaz de melhorar motilidades total e/ou progressiva das células após congelamento / descongelamento.

Os lipídeos são extremamente sensíveis à oxidação e têm uma solubilidade muito limitada em água, fatores que limitam consideravelmente as suas utilizações. Os antioxidantes são agentes bem conhecidos que podem ser usados para retardar a oxidação deste. As ciclodextrinas ganharam atenção considerável para retardar a oxidação por formação de complexos de inclusão. A característica do complexo com a ciclodextrina depende tanto da natureza destas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ou um derivado) como do número de ligações duplas e do comprimento da cadeia do ácido graxo utilizado.



**Tabela 4:** Percentual de motilidade total (MT) e progressiva (MP) de espermatozóides equinos sem tratamento (CT), tratados com 2 mg de ciclodextrina carregada com colesterol (CCC), 2 mg de ciclodextrina carregada com estigmastanol (CCE), 1, 2 e 3 mg de ciclodextrina carregada com óleo de salmão (S1, S2 e S3) e 1, 2 e 3 mg de ciclodextrina carregada com óleo de semente de linho (L1, L2 e L3) por  $120 \times 10^6$  espermatozóides.

TRAT	CT	CCC	CCE	S1	S2	S3	L1	L2	L3	EPM
MT (%)	65	65	66	66	66	61	66	70	65	4,5
MP (%)	31	32	33	32	34	30	32	37	34	3,4

( $p > 0,05$ , n = 12, 5 garanhões - 5,3,2,1,1 ejaculados).

Ao testar os efeitos de complexos com ciclodextrinas, um experimento realizado em 2011 revelou diferença significativa quando se compara a oxidação do ácido linoleico conjugado com  $\beta$ -ciclodextrina. Sem antioxidantes presentes, cerca de 97% do ácido linoleico foi oxidado aos 40 minutos, em comparação com menos de 1% no complexo. Ainda, depois de 250 horas, cerca de 35% do ácido permaneciam sem oxidação (Ying *et al.*, 2011).

Quanto ao tipo de ciclodextrina utilizado, Szente *et al.* (1993) não encontraram diferenças entre os efeitos estabilizadores de  $\alpha$  e  $\beta$  ciclodextrinas quando estudando oxidação. Porém Na *et al.* (2011) revelaram que a  $\gamma$ -ciclodextrina foi mais eficiente que a  $\beta$ -ciclodextrina quanto à estabilidade de emulsão e eficiência de encapsulação quando da utilização com complexo com óleo de peixe (28% EPA; C20:5 e 31% DHA; C22-6).

O aumento da solubilidade dos ácidos graxos com inclusão às ciclodextrinas é proporcionalmente maior para ácidos graxos mais longos (C12) do que para aqueles que são mais curtos (C6), embora a sua solubilidade em água ainda seja muito baixo quando comparado a ácidos graxos mais curtos.

Quando se formam complexos de inclusão com ciclodextrina, foi demonstrado que a  $\alpha$ -ciclodextrina tem a afinidade mais elevada para ácidos graxos de cadeia longa ( $\geq C12$ ) e curta ( $\leq C8$ ). Isto pode ser explicado pelo fato de que uma distância menor entre átomos de moléculas hospedeiras e hóspedes resultam numa interação mais forte.

Para os ácidos graxos com 16-18 átomos de carbono, a  $\gamma$ -ciclodextrina foi superior à  $\alpha$  e  $\beta$  em melhorar estabilização contra a auto-oxidação (Regiert *et al.*,

1996). Já para ácidos graxos com 18-22 átomos de carbono, a utilização dos derivados metil e hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrinas mostrou que o aumento do número de ligações duplas nos ácidos graxos resulta num complexo de inclusão mais estável. Isto pode ser devido à geometria mais compacta e estrutura não linear do ácido graxo, que proporciona um melhor encaixe na cavidade dessas ciclodextrinas (Szente *et al.*, 1993).

Embora tenha sido utilizado a metil- $\beta$ -ciclodextrina no presente estudo (ciclodextrina de eleição para os ácidos graxos aqui utilizados), não se avaliou a capacidade da mesma em incorporar os ácidos graxos presentes nos óleo de salmão e de semente de linho.

Moore *et al.* (2005a), trabalhando com 15 garanhões não encontraram diferença nas motilidades total e progressiva para sêmen tratado com 0,5; 1,5, 3,0; 4,5; 6,0 e 7,5 mg de CCC. Porém, quando agruparam esses garanhões em dois grupos (“bons” congeladores – motilidade progressiva  $\geq$  40% e “maus” congeladores - motilidade progressiva  $\leq$  40%), obtiveram melhor motilidade total com utilização de 1,5 mg de CCC no segundo grupo.

Porém nem mesmo o tratamento com 2 mg de CCC foi capaz de melhorar as motilidades do sêmen após descongelamento, nos animais aqui avaliados, que podem ser incluídos no grupo de “maus” congeladores.

#### **3.2.4. Conclusões**

- O tratamento do sêmen com metil- $\beta$ -ciclodextrina carregada com colesterol, estigmastanol, óleo de salmão e óleo de semente de linho não é capaz de alterar os parâmetros de motilidade total e progressiva de espermatozoides equinos, após descongelamento.

**3.3. Experimento 2:** Utilização de sonicação de diferentes fontes de lipídeos para melhorar motilidade de células espermáticas criopreservadas.

### **3.3.1. Objetivos**

- Avaliar efeito da sonicação de óleo de salmão, óleo de semente de linho, óleo de açafreão-bastardo, óleo de fígado de bacalhau e gema de ovo de galinha na motilidade do sêmen após congelamento convencional e após choque por baixa temperatura.

- Avaliar efeito da metil- $\beta$ -ciclodextrina carregada com colesterol e estigmastanol na motilidade do sêmen após choque por baixa temperatura.

### **3.3.2. Material e métodos**

#### **3.3.2.1. Sonicação**

Foram utilizados óleo de semente de linho (Natural Cold Pressed Flaxseed Oil - 1200 mg, Nature's Bounty, Inc. Bohemia, NY – USA), óleo de açafreão-bastardo (High Heat Safflower Oil, Celestial Group, Inc., Melville, NY – USA), óleo de salmão (Cold Water Salmon Oil - 1000 mg, Nature's Bounty, Inc. Bohemia, NY – USA), óleo de fígado de bacalhau (Norwegian Cod Liver Oil, J. R. Carlson Laboratories, Inc., Arlington Hts., IL – USA) e gema de ovo de galinha.

Foram elaboradas soluções a uma concentração de 150 mg / mL com cada um dos compostos. Para isso 1,5 g de cada uma das fontes de lipídeos citadas acima foram adicionados a 8,5 mL de meio MW (Modified Whitten's Medium, Anexo 8.1) em tubos de vidro 18 x 150 mm (1,5 g foram considerados como 1,5 mL).

A solução foi sonicada em aparelho Brason Sonifier 450 (output 20% e ciclo constante) por 3 minutos. Após sonicação o tubo foi colocado em banho-maria em água com gelo para resfriar.

As amostras foram aliqotadas em tubos de vidro de 1 mL e congeladas a -20 °C até utilização. Antes da utilização, as amostras foram descongeladas, aquecidas a 37 °C e agitadas em vortex em velocidade máxima por 10 segundos.

### **3.3.2.2. Incorporação à metil-β-ciclodextrina**

Colesterol e estigmastanol incorporados à ciclodextrina também foram utilizados. Para incorporar colesterol (C8667, 5g / Sigma) e estigmastanol (S4297, 1g / Sigma) à metil-β-ciclodextrina (C4555, 10g / Sigma), 200 mg de cada composto foram adicionados a 1 mL de Clorofórmio (4440-08, 4L / Mallinckrodt Chemicals) em um tubo de vidro (12 x 75 mm). Em outro tubo de vidro, 1g de metil-β-ciclodextrina foi adicionada a 2 mL de metanol (A412-4, 4L / Fisher Scientific). Quatrocentos e cinquenta microlitros da primeira solução foram adicionados à segunda, e o tubo agitado em vortex até a solução ficar translúcida (quando necessário foi adicionado um pouco mais de metanol). A solução foi então colocada em uma placa de Petri de vidro para secagem em fluxo de nitrogênio por 24 horas. O conteúdo da placa foi então raspado com espátula e armazenado em tubos de plástico a cerca de 22 °C. A solução trabalho foi feita adicionando 50 mg do conteúdo desidratado a 1 mL de meio MW a 37 °C e agitando-a em vortex até completa dissolução. A solução foi mantida a 5 °C entre as utilizações, e sempre aquecida a 37 °C e agitada vigorosamente antes da adição ao sêmen.

### **3.3.2.3. Coleta e preparação do sêmen**

Sêmen de seis garanhões com idade entre 15 e 21 anos, das raças Puro-Sangue Inglês, Quarto de Milha e Árabe; estabelecidos no Laboratório de Reprodução Equina da Universidade Estadual do Colorado (CSU, Fort Collins-CO, USA) foram utilizados neste estudo, estando os animais em regime de coleta

rotineiro três vezes por semana, e mantidos sob diretrizes impostas pelo Comitê de Utilização e Cuidados dos Animais da CSU.

Os ejaculados foram coletados com utilização de vagina artificial modelo CSU (Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA). Uma pequena amostra foi diluída a  $50 \times 10^6$  de espermatozoides/mL em EZ-Mixin<sup>®</sup> Basic Formula Extender (Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA) e as motilidades total e progressiva foram determinadas utilizando CASA (Computer Assisted Sperm Analysis; IVOS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA). Se o ejaculado apresentasse motilidade total superior a 60% era então diluído 1:1 em MW e transportado até o laboratório para processamento.

#### *Congelamento convencional*

Passados no máximo 45 minutos após a coleta e diluição o sêmen foi centrifugado a 400 g / 7,5 minutos em tubos cônicos de 15 mL e ressuspenso para  $120 \times 10^6$  espermatozoides / mL em MW, sendo 2 mL colocados em diferentes tubos de vidro (13 x 100 mm) e utilizados para cada um dos onze tratamentos:

- 1- CT: sêmen sem nenhum aditivo;
- 2- S3: adição de 3 mg de óleo de salmão / mL de sêmen;
- 3- S6: adição de 6 mg de óleo de salmão / mL de sêmen;
- 4- L3: adição de 3 mg de óleo de semente de linho / mL de sêmen;
- 5- L6: adição de 6 mg de óleo de semente de linho / mL de sêmen;
- 6- G3: adição de 3 mg de gema de ovo de galinha / mL de sêmen;
- 7- G6: adição de 6 mg de gema de ovo de galinha / mL de sêmen;
- 8- B3: adição de 3 mg de óleo de fígado de bacalhau / mL de sêmen;
- 9- B6: adição de 6 mg de óleo de fígado de bacalhau / mL de sêmen;
- 10- A3: adição de 3 mg de óleo de açafreão-bastardo / mL de sêmen;
- 11- A6: adição de 6 mg de óleo de açafreão-bastardo / mL de sêmen.

As amostras foram mantidas por 15 minutos a aproximadamente 22 °C e então diluídas a  $40 \times 10^6$  espermatozóides / mL em meio de congelamento Sacarose-EDTA (Anexo 8.4). Os tubos foram vedados com parafilme e inseridos em um becker de 150 mL contendo 100 mL de água nanopure a aproximadamente 22 °C.

O conjunto foi então mantido em sala refrigerada a 5 °C por 2 horas, de forma a permitir manutenção da temperatura durante o envase do sêmen em palhetas de 0,5 mL. O congelamento foi realizado no interior da sala refrigerada, em caixa de isopor, colocando-se as palhetas a 7 cm do nível do nitrogênio em rampa flutuante por 15 minutos (-60 °C/min; Cochran *et al.*, 1984; Cristanelli *et al.*, 1985; Pickett *et al.*, 1987), quando então foram imergidas em nitrogênio líquido para armazenamento nos botijões até avaliação.

#### *Choque por baixa temperatura*

Passados no máximo 45 minutos após a coleta e diluição o sêmen foi centrifugado a 400 g / 7,5 minutos em tubos cônicos de 15 mL e ressuspenso para concentração de  $120 \times 10^6$  espermatozóides / mL em MW, sendo 2,5 mL colocados em diferentes tubos de vidro (13 x 100 mm) e utilizados para cada um dos oito tratamentos:

- 1- CT: sêmen sem nenhum aditivo;
- 2- S6: adição de 6 mg de óleo de salmão / mL de sêmen;
- 3- L6: adição de 6 mg de óleo de semente de linho / mL de sêmen;
- 4- G6: adição de 6 mg de gema de ovo de galinha / mL de sêmen;
- 5- B6: adição de 6 mg de óleo fígado de bacalhau / mL de sêmen;
- 6- A6: adição de 6 mg de óleo de açafraão-bastardo / mL de sêmen;
- 7- CCE: adição de 2 mg de ciclodextrina carregada com estigmastanol / mL sêmen;
- 8- CCC: adição de 2 mg de ciclodextrina carregada com colesterol / mL sêmen.

As amostras foram mantidas por 15 minutos a aproximadamente 22 °C. Quinhentos microlitros foram retirados de cada amostra para avaliação da motilidade total e progressiva após o período de incubação (Tempo 1 – T1).

Os tubos com os 2 mL restantes foram vedados com parafilme e colocados em banho-maria a 0 °C (água + gelo) e aí mantidos em uma sala refrigerada a 5 °C por 30 minutos. Após incubação à 0 °C, 0,5 mL foi pipetado em outro tubo (55 x 12 mm) e este mantido em banho-maria a 37 °C / 5 minutos antes da avaliação da motilidade total e progressiva (Tempo 2 – T2). Os 1,5 mL restantes foram diluídos em Sacarose-EDTA para concentração de  $40 \times 10^6$  espermatozóides / mL e envasados em palhetas de 0,5 mL dentro da sala a 5 °C.

O congelamento foi realizado colocando-se as palhetas a 7 cm do nível de nitrogênio em rampa flutuante por 15 minutos (-60 °C/min; Cochran *et al.*, 1984; Cristanelli *et al.*, 1985; Pickett *et al.*, 1987), quando então foram imergidas em nitrogênio líquido para armazenamento nos botijões e futura avaliação (Tempo 3 – T3).

#### **3.3.2.4. Análise estatística**

As variáveis-dependentes consideradas foram motilidade total e progressiva do sêmen. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA). Diferenças entre tratamentos foram checadas pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) com 5% de probabilidade de erro (Statistical Analysis Systems (SAS); Cary NC, USA).

#### **3.3.3. Resultados e discussão**

Não houve diferença entre os tratamentos no que se refere às motilidades total e progressiva dos espermatozóides após descongelamento, quando se utilizou congelamento convencional ( $p > 0,05$ , Tabela 5). Não houve interação entre os fatores.

**Tabela 5:** Percentual de motilidade total (MT) e progressiva (MP) de espermatozóides equinos sem tratamento (CT) ou tratados com 3 e 6 mg de óleos de salmão (S3 e S6), de semente de linho (L3 e L6), de fígado de bacalhau (B3 e B6), de açafraão-bastardo (A3 e A6) e de gema de ovo de galinha (G3 e G6) sonicados em meio MW antes da utilização na criopreservação convencional.

Trat	CT	S3	S6	L3	L6	G3	G6	B3	B6	A3	A6	EPM
<b>MT (%)</b>	68	69	63	67	65	66	64	65	64	71	70	3,9
<b>MP (%)</b>	36	35	32	36	32	35	33	32	30	39	38	2,3

( $p > 0,05$ ,  $n = 15$ , 4 garanhões - 6,4,3,2 ejaculados).

Consideram-se choque térmico as mudanças que ocorrem nos espermatozóides quando são rapidamente resfriados da temperatura corporal para a temperatura de zero grau (Jasko, 1994). No presente estudo, quando se submeteu os espermatozóides a 0 °C, algumas diferenças foram notadas entre os tratamentos.

Analisando as motilidades total e progressiva, nenhum dos tratamentos afetou essas variáveis após o período de incubação (T1). Porém após incubação do sêmen a 0 °C por 30 minutos (T2) e após o congelamento (T3), os espermatozóides tratados com gema de ovo, estigmastanol e colesterol apresentaram melhores motilidades total e progressiva.

Ainda analisando os tratamentos com gema de ovo, estigmastanol e colesterol, nota-se que a motilidade progressiva foi preservada ao longo do processamento do sêmen, não havendo diferenças entre as motilidades progressivas entre os diferentes tempos para estes tratamentos ( $p < 0,05$ , Tabela 6).

Grady *et al.* (2009), suplementando garanhões por 84 dias com 60 g/dia de mistura de linhaça+algas ou 150 g/dia de mistura peletizada à base de peixe (ambas baseadas em ácidos graxos ômega-3) não observaram melhora nas motilidades total e progressiva e na morfologia espermática do sêmen fresco, resfriado por 24 ou 48 horas ou congelado ao longo do tratamento.



**Tabela 6:** Percentual de motilidade total (MT) e progressiva (MP) de espermatozóides equinos sem tratamento (CT), ou tratados com 6 mg de óleos de salmão (S6), de semente de linho (L6), de fígado de bacalhau (B6), de açafreão-bastardo (A6) e gema de ovo de galinha (G6) sonicados em meio MW, e com 2 mg de ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) e estigmastanol (CCE) após incubação (T1), após choque por baixa temperatura (T2) e após congelamento precedido por choque por baixa temperatura (T3).

TRATAMENTO	%	T1	T2	T3	EPM
CT	MT	<sup>A</sup> 83 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 37 <sup>d</sup>	<sup>B</sup> 36 <sup>c</sup>	2,9
	MP	<sup>A</sup> 29 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 12 <sup>c</sup>	<sup>B</sup> 15 <sup>b</sup>	2,3
S6	MT	<sup>A</sup> 78 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 41 <sup>cd</sup>	<sup>B</sup> 40 <sup>bc</sup>	3,4
	MP	<sup>A</sup> 31 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 14 <sup>bc</sup>	<sup>B</sup> 17 <sup>ab</sup>	2,6
L6	MT	<sup>A</sup> 76 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 44 <sup>cd</sup>	<sup>B</sup> 41 <sup>bc</sup>	3,6
	MP	<sup>A</sup> 25 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 14 <sup>bc</sup>	<sup>B</sup> 17 <sup>ab</sup>	2,1
G6	MT	<sup>A</sup> 78 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 57 <sup>bc</sup>	<sup>B</sup> 53 <sup>ab</sup>	3,1
	MP	<sup>A</sup> 28 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 21 <sup>ab</sup>	<sup>A</sup> 26 <sup>a</sup>	2,1
B6	MT	<sup>A</sup> 76 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 45 <sup>cd</sup>	<sup>B</sup> 39 <sup>bc</sup>	3,6
	MP	<sup>A</sup> 27 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 15 <sup>bc</sup>	<sup>B</sup> 14 <sup>b</sup>	2,1
A6	MT	<sup>A</sup> 78 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 45 <sup>cd</sup>	<sup>B</sup> 41 <sup>bc</sup>	3,9
	MP	<sup>A</sup> 30 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 15 <sup>bc</sup>	<sup>B</sup> 18 <sup>ab</sup>	2,6
CCE	MT	<sup>A</sup> 82 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 68 <sup>ab</sup>	<sup>C</sup> 58 <sup>a</sup>	3,0
	MP	<sup>A</sup> 28 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 23 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 25 <sup>a</sup>	2,2
CCC	MT	<sup>A</sup> 82 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 79 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 61 <sup>a</sup>	3,3
	MP	<sup>A</sup> 23 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 21 <sup>ab</sup>	<sup>A</sup> 23 <sup>ab</sup>	1,9

<sup>A,B</sup> sobrescritos na mesma linha indicam diferenças no tratamento entre tempos diferentes ( $p < 0,05$ ). <sup>a,b,c,d</sup> sobrescritos na mesma coluna indicam diferenças entre tratamentos no mesmo tempo ( $p < 0,05$ ,  $n = 13$ , 6 garanhões - 5,3,2,1,1,1 ejaculados).

Kandelousi *et al.* (2013) trataram sêmen bovino com ácidos graxos ômega 3, 6 e 9 após sonicação em meio de congelamento contendo polietilenoglicol para melhor dissolução do óleo utilizado. Os autores relataram piora nas motilidades total e progressiva e na viabilidade espermática após congelamento.

Estudos de Maldjian *et al.* (2005) mostraram que a adição de DHA na gema de ovo do diluidor de sêmen não melhorou a qualidade seminal de suínos após a criopreservação.

Com relação à gema de ovo, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são consideradas responsáveis pelo seu efeito crioprotetor. Aderem à superfície da membrana celular durante o processo de criopreservação, restaurando a perda de

fosfolipídeos e, aparentemente, induzindo alteração transitória de sua composição, o que previne a ruptura da mesma, melhorando a qualidade seminal (Farstard, 1996; Moussa *et al.*, 2002).

Como dito anteriormente, espécies com alto teor de colesterol na membrana plasmática dos espermatozóides são mais resistentes ao choque por baixa temperatura, o que foi comprovado neste estudo.

Moraes *et al.* (2010), trabalhando com colestanol e desmosterol (esteróis semelhantes ao colesterol e estigmastanol) concluíram que estes têm efeito benéfico nas motilidades total e progressiva, assim como o colesterol, na viabilidade seminal após congelamento do sêmen de touros.

No presente estudo o estigmastanol também apresentou efeito benéfico na sobrevivência espermática após exposição dos espermatozóides à baixa temperatura, o que sugere modo de atuação semelhante ao colesterol.

#### **3.3.4. Conclusões**

- O tratamento do sêmen com óleo de salmão, óleo de semente de linho, óleo de açafreão-bastardo, óleo de fígado de bacalhau e gema de ovo de galinha sonicados em meio MW não é capaz de melhorar parâmetros de motilidade total e progressiva de espermatozóides equinos, após congelamento convencional.

- O tratamento do sêmen com gema de ovo de galinha sonicada em meio MW mantém a motilidade progressiva das células durante o choque térmico e posterior congelamento e melhora as motilidades total e progressiva dessas células após o choque térmico.

- O tratamento com metil- $\beta$ -ciclodextrina carregada com colesterol e estigmastanol mantém a motilidade progressiva das células durante o choque térmico e posterior congelamento e melhora as motilidades total e progressiva dessas células após o choque térmico.

**3.4. Experimento 3:** Utilização da Cromatografia Gasosa para avaliar diferentes métodos de incorporação de lipídeos à membrana plasmática.

#### **3.4.1. Objetivos**

- Avaliar capacidade do etanol, da metil- $\beta$ -ciclodextrina e da sonicação em alterar o perfil de ácidos graxos da membrana de espermatozóides quando utilizados como carreadores do óleo de semente de linho.

#### **3.4.2. Material e métodos**

##### **3.4.2.1. Dissolução em etanol**

A solução trabalho foi feita adicionando óleo de semente de linho (Natural Cold Pressed Flaxseed Oil - 1200 mg, Nature's Bounty, Inc. Bohemia, NY – USA) em etanol absoluto (Pharmaco-AAPER) para concentração de 1,5 mg / mL. A solução foi mantida em tubos de vidro a 5 °C até utilização.

##### **3.4.2.2. Incorporação à metil- $\beta$ -ciclodextrina**

Para incorporar óleo de semente de linho (Natural Cold Pressed Flaxseed oil - 1200 mg, Nature's Bounty, Inc. Bohemia, NY – USA) à ciclodextrina, 120 mg deste foram dissolvidos em 1 mL de Clorofórmio (4440-08, 4L / Mallinckrodt Chemicals) em um tubo de vidro (12 x 75 mm). Em outro tubo de vidro, 1g de metil- $\beta$ -ciclodextrina foi adicionada a 2 mL de metanol (A412-4, 4L / Fisher Scientific). Quatrocentos e cinquenta microlitros da primeira solução foram adicionados à segunda e o tubo agitado em vortex até a solução ficar translúcida (quando necessário foi adicionado um pouco mais de metanol). A solução foi então colocada em uma placa de Petri de vidro para secagem em fluxo de nitrogênio por 24 horas. O conteúdo da placa foi então raspado com espátula e

armazenado em tubos de plástico a cerca de 22 °C. A solução trabalho foi feita adicionando 50 mg do conteúdo desidratado a 1 mL de meio MW (Modified Whitten's Medium, Anexo 8.1) a 37 °C e agitando-a em vortex até completa dissolução. A solução foi mantida a 5 °C entre as utilizações, e sempre aquecida a 37 °C e agitada vigorosamente antes da adição ao sêmen.

#### **3.4.2.3. Sonicação**

Foi elaborada solução de óleo de semente de linho (Natural Cold Pressed Flaxseed Oil - 1200 mg, Nature's Bounty, Inc. Bohemia, NY – USA) em meio MW a uma concentração de 150 mg / mL. Para isso 1,5 g deste óleo foram adicionados a 8,5 mL de meio MW em tubos de vidro 18 x 150 mm.

A solução foi sonicada em aparelho Brason Sonifier 450 (output 20% e ciclo constante) por 3 minutos. Após sonicação o tubo foi colocado em banho-maria em água com gelo para resfriar.

Amostras foram aliqüotadas em tubos de vidro de 1 mL e congeladas a -20 °C até utilização. Antes da utilização as amostras eram descongeladas, aquecidas a 37 °C e agitadas em vortex em velocidade máxima por 10 segundos.

#### **3.4.2.4. Coleta e preparação do sêmen para análise por cromatografia gasosa**

Sêmen de quatro garanhões com idade entre 15 e 21 anos, das raças Puro-Sangue Inglês, Quarto de Milha e Árabe; estabelecidos no Laboratório de Reprodução Equina da Universidade Estadual do Colorado (CSU, Fort Collins-CO, USA) foram utilizados neste estudo, estando os animais em regime de coleta rotineiro três vezes por semana e mantidos sob diretrizes impostas pelo Comitê de Utilização e Cuidados dos Animais da CSU.

Os ejaculados foram coletados com vagina artificial modelo CSU (Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA). Uma pequena amostra foi diluída a 50 x

$10^6$  de espermatozoides/mL em EZ-Mixin<sup>®</sup> Basic Formula Extender (Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA) e as motilidades total e progressiva foram determinadas utilizando CASA (Computer Assisted Sperm Analysis; IVOS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA). Ejaculados com motilidade total superior a 60% foram então diluídos 1:1 em MW e transportados até o laboratório para processamento.

Passados no máximo 45 minutos após a coleta e diluição o sêmen foi centrifugado a 400 g / 7,5 minutos em tubos cônicos de 15 mL e ressuspenso para  $120 \times 10^6$  espermatozoides / mL em MW, sendo 5 mL colocados em tubos de vidro (13 x 100 mm) e utilizados para cada um dos quatro tratamentos:

- 1- CT: sêmen sem aditivo;
- 2- L1: adição de 6 µg de óleo de semente de linho em etanol / mL de sêmen;
- 3- L2: adição de 2 mg ciclodextrina carregada com óleo de semente de linho / mL de sêmen;
- 4- L3: adição de 6 mg de óleo de semente de linho sonificado em MW / mL de sêmen.

As amostras foram mantidas por 15 minutos a aproximadamente 22 °C e então centrifugadas em tubos cônicos de 15 mL a 400 g / 10 minutos através de 1,5 mL de Percoll 30 % em PBS (Anexo 8.5) para remoção dos lipídeos não incorporados aos espermatozoides. O sobrenadante foi aspirado e o pellet contendo espermatozoides transferido para outro tubo de 15 mL contendo 1 mL de PBS para ressuspenso. Uma segunda centrifugação foi feita a 800 g / 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado e 1,5 mL de PBS foram adicionados ao pellet para ressuspenso. A concentração de cada amostra foi mensurada num densímetro (590a, Animal Reproduction Systems) e anotada. Cada amostra foi pesada em um tubo de vidro (18 x 150 mm), previamente identificado e pesado. Os tubos com as amostras foram mantidos em estufa a 100 °C por dois dias para secagem.

Após este período os tubos contendo o material desidratado foram pesados novamente. Quatro mililitros de uma mistura 2:1 (clorofórmio:metanol) foram adicionados aos tubos, que então foram sonicados em banho-maria (Bransonic Ultrasonic Cleaner Bath, Model Branson 1210, Danbury, CT-USA) por 30 segundos e agitados por 20 minutos em agitador orbital a 100 RPM (IKA-Vibrax-VXR, Janke & Kunkel GMBH & Co., Staufen, Germany).

Para auxiliar na ressuspensão do material foi utilizado espátula de metal para raspagem dos tubos. Os tubos foram invertidos duas vezes para homogeneizar o conteúdo, que foi filtrado para um segundo tubo através de filtros de papel (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire – UK, Model Whatman 54, retenção de partículas  $\geq 22 \mu\text{m}$ ). A cada tubo foi adicionado 0,8 mL de solução de NaCl 0,59% (0,2 volume para cada 1 volume clorofórmio-metanol). Os tubos foram vedados com parafilme e mantidos a 5 °C por aproximadamente 18 horas.

A solução foi colocada em temperatura de laboratório e se apresentava em duas fases, estando os lipídeos na fase inferior. Esta fração foi então removida com uma pipeta de Pasteur de vidro longa (22 cm) e colocada em tubo de vidro de 20 mL previamente identificado e pesado. Os tubos foram colocados em fluxo de gás nitrogênio em banho-maria a 37 °C até a secagem. Após secagem foram mantidos por mais 2 horas em capela de fluxo de ar para completa evaporação do solvente e então colocada em estufa a 100 °C por 24 horas (Folch *et al.*, 1957; modificado por Bligh & Dyer, 1959).

Para saponificação e metilação de lipídeos, os tubos foram retirados da estufa e colocados em dessecador para resfriamento por 3 horas. Os tubos foram pesados e seus pesos anotados. Um mililitro de solução KOH 0,5 N em metanol (2,81 g de KOH em 100 mL de metanol) foi adicionado em cada tubo, que permaneceu por 10 minutos em banho-maria a 70 °C para permitir saponificação. As amostras foram retiradas do banho-maria e 1 mL de BF<sub>3</sub> (trifluoreto de boro) a 14% em metanol foi adicionado a cada tubo (transformação do ácido graxo em éster metílico), que foi tampado e colocado em banho-maria a 70 °C por 30 minutos. Os tubos foram retirados do banho-maria para resfriamento à temperatura do laboratório (~22 °C). Dois mililitros de hexano grau-HPLC e dois

mililitros de solução saturada de NaCl (31,7 g de NaCl em 100 mL de água nanopure) foram adicionados aos tubos. Cada amostra foi agitada em vortex por 1 minuto em velocidade máxima.

Duas fases se encontravam distintas novamente. A camada superior contendo ésteres metílicos em hexano foi pipetada e transferida para um tubo de vidro (18 x 150 mm) contendo 800 mg de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, que foi agitado em vortex brevemente. O hexano líquido foi pipetado deste tubo e transferido para um tubo de vidro de 20 mL. Um mililitro de hexano foi adicionado ao tubo contendo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, que foi novamente agitado em vortex brevemente. Todo o hexano líquido restante foi transferido para o tubo de 20 mL. Os tubos foram colocados em fluxo de gás nitrogênio em banho-maria a 37 °C para evaporação do hexano. Após secagem completa, 500 µL de hexano foram adicionados em cada amostra para reconstituição dos lipídeos, e 250 µL da solução foram pipetados em um tubo amostrador automático de 300 µL, que permaneceu congelado a -80 °C até a leitura por Cromatografia Gasosa (Park & Goins, 1994; modificado por Phillips *et al.*, 2010).

#### **3.4.2.5. Análise estatística**

Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA). Comparação das médias foi analisada pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) com 5% de probabilidade de erro (Statistical Analysis Systems (SAS); Cary NC, USA).

#### **3.4.3. Resultados e discussão**

Os valores percentuais encontrados para os diferentes ácidos graxos analisados (14:0, 14:1, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 20:0, 20:2, 22:0, 22:1, 22:2, 22:4, 22:5 e 22:6) para os diferentes tratamentos foram respectivamente 3,6; 0,5; 17,4; 4,2; 10,7; 6,6; 0,8; 3,1; 2,4; 3,0; 0,0; 1,2; 1,9; 3,7 e 1,4 para o sêmen sem

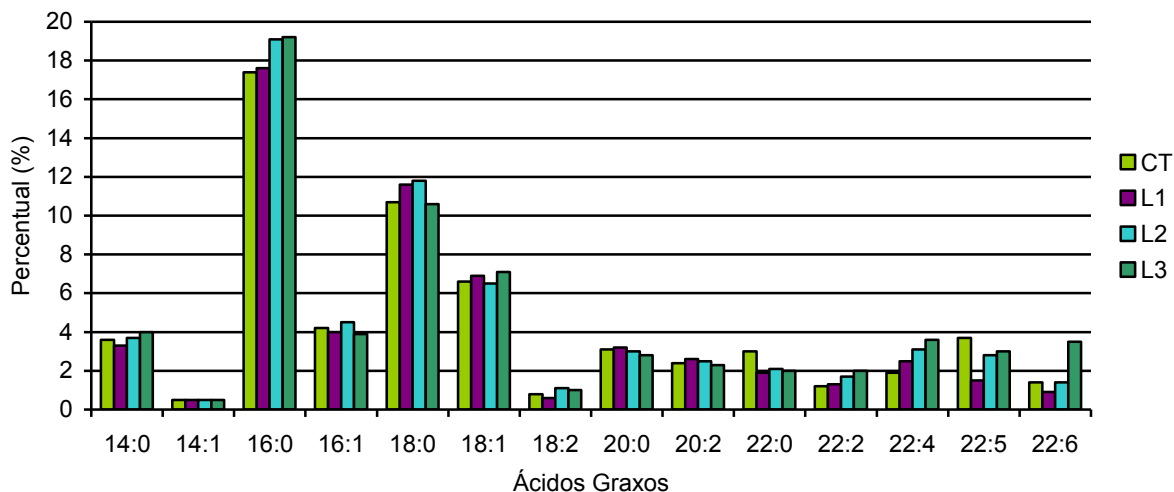
tratamento; 3,3; 0,5; 17,6; 4,0; 11,6; 6,9; 0,6; 3,2; 2,6; 1,9; 0,0; 1,3; 2,5; 1,5 e 0,9 para o sêmen tratado com 6 µg de óleo de semente de linho em etanol; 3,7; 0,5; 19,1; 4,5; 11,8; 6,5; 1,1; 3,0; 2,5; 2,1; 0,0; 1,7; 3,1; 2,8 e 1,4 para e sêmen tratado com 2 mg de óleo de semente de linho-ligado-ciclodextrina e 4,0; 0,5; 19,2; 3,9; 10,6; 7,1; 1,0; 2,8; 2,3; 2,0; 0,0; 2,0; 3,6; 3,0 e 3,5 para o sêmen tratado com 6 mg de óleo de semente de linho sonicado em MW (Figura 3).

Nenhum dos métodos utilizados na tentativa de incorporar óleo de semente de linho aos espermatozóides foi eficiente. Não houve diferença entre os valores percentuais encontrados para cada um dos ácidos graxos nos diferentes tratamentos ( $p>0,05$ ). Esses resultados justificam em parte os resultados encontrados nos experimentos 1 e 2, onde não se observou melhora na motilidade do sêmen após tratamento com óleo de semente de linho. Não houve interação entre os fatores.

O óleo de semente de linho utilizado neste estudo é rico em ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3 – ômega 3 - 45% dos lipídeos), ácido linoleico (18:2 – ômega 6 - 11% do lipídeos) e ácido oleico (18:1 – ômega 9 – 11% dos lipídeos), contendo ainda 5% de outros ácido graxos. Durante a leitura das amostras tratadas com óleo de semente de linho pela cromatografia gasosa não foram observados picos que correspondessem a esses ácidos graxos que diferissem dos picos para o sêmen não tratado.

Com relação ao perfil lipídico da membrana dos espermatozóides equinos, os resultados encontrados corroboram com as análises de Parks & Lynch (1992), com excessão dos valores encontrados para o ácido docosapentaenóico (DPA; 22:5, n-3 e n-6). Segundo estes autores este ácido graxo representa cerca de 45-70% dos ácidos graxos ligados à colina, etanolamina e esfingomielina, que são as classes de fosfolipídeos mais abundantes nas células espermáticas de mamíferos. No presente estudo este percentual foi de aproximadamente 3%. Os autores acima citados não relataram a raça dos garanhões utilizados, sendo utilizados quatro ejaculados para as referidas análises.





**Figura 3:** Perfil dos ácidos graxos da membrana plasmática de células espermáticas equinas sem tratamento (CT) ou tratadas com óleo de semente de linho dissolvido em etanol (L1), incorporado à metil- $\beta$ -ciclodextrina (L2) ou sonicado em meio MW (L3). ( $p > 0,05$ ,  $n = 6$ , 6 garanhões – 1 ejaculado de cada garanhão).

### 3.4.4. Conclusões

- O tratamento do sêmen equino com óleo de semente de linho diluído em etanol, ligado à metil- $\beta$ -ciclodextrina ou sonicado em meio MW não é capaz de incorporar os ácidos graxos insaturados presentes nesse óleo à membrana dos espermatozóides.

## 4. CAPÍTULO 2

### COLESTEROL E FOSFOLIPÍDEOS NA MEMBRANA ESPERMÁTICA DE GARANHÕES

#### 4.1. Introdução

Espécies que possuem altas proporções de colesterol em relação aos fosfolipídeos, a exemplo dos humanos e coelhos (0,99 e 0,88, respectivamente; Watson, 1981), são mais resistentes ao choque por baixas temperaturas (Meseguer *et al.*, 2004; Mocé & Graham, 2006). O contrário ocorre em espécies com menor proporção de colesterol, como suínos (0,26) e equinos (0,36; Parks & Lynch, 1992).

O colesterol tem múltiplos efeitos nas membranas, incluindo sua estabilização, redução da sua permeabilidade, melhoria de suas características morfológicas e possibilidade de interações célula-célula, influenciando na fase de transição da membrana, fornecendo microambiente adequado para as proteínas integrais e periféricas da membrana e servindo como antioxidante (Crockett, 1998).

A remoção deste lipídeo da membrana promove desestabilização da mesma devido à reorganização dos componentes da bicamada (Amann & Graham, 1993; Gadella *et al.*, 2001) e pode induzir capacitação espermática prematura, reduzindo sua viabilidade nos órgãos reprodutivos da fêmea (Watson, 1995).

Sabe-se que perdas de colesterol da membrana plasmática em células criopreservadas ocorrem, tendo sido observadas perdas de 50% em suínos e 28% em garanhões (Cerolini *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2005a). Desta forma, a incorporação de colesterol ou outros compostos que também atuem na estabilização da membrana espermática antes do processo de criopreservação seriam benéficos para os espermatozóides após o descongelamento.

Objetivou-se com este estudo determinar a quantidade de colesterol na membrana plasmática de células espermáticas equinas a fresco tratadas com diferentes quantidades de CCC, e estabelecer a relação colesterol:fosfolipídeos presente nas membranas.

## **4.2. Material e métodos**

### **4.2.1. Incorporação à metil- $\beta$ -ciclodextrina**

Para incorporar colesterol (C8667, 5g / Sigma) e estigmastanol (S4297, 1g / Sigma) à metil- $\beta$ -ciclodextrina (C4555, 10g / Sigma), 200 mg de cada um foram adicionados a 1 mL de Clorofórmio (4440-08, 4L / Mallinckrodt Chemicals) em um tubo de vidro (12 x 75 mm). Em outro tubo de vidro 1g de metil- $\beta$ -ciclodextrina foi adicionado a 2 mL de metanol (A412-4, 4L / Fisher Scientific). Quatrocentos e cinquenta microlitros da primeira solução foram adicionados a segunda e o tubo agitado em vortex até a solução ficar translúcida (quando necessário foi adicionado um pouco mais de metanol). A solução foi então colocada em uma placa de Petri de vidro para secagem em fluxo de nitrogênio por 24 horas. O conteúdo da placa foi então raspado com spatula e armazenado em tubos de plástico a cerca de 22 °C. A solução trabalho foi feita adicionando 50 mg do conteúdo desidratado a 1 mL de MW (Modified Whitten's Medium, Anexo 8.1) a 37 °C e agitando-a em vortex até completa dissolução. A solução foi mantida a 5 °C até a próxima utilização, e sempre aquecida a 37 °C e agitada vigorosamente antes da utilização.

### **4.2.2. Coleta e preparação do sêmen para análise de colesterol e fosfolipídeos**

Sêmen de cinco garanhões com idade entre 15 e 21 anos, das raças Puro-Sangue Inglês, Quarto de Milha e Árabe; estabulados no Laboratório de

Reprodução Equina da Universidade Estadual do Colorado (CSU, Fort Collins-CO, USA) foram utilizados neste estudo, estando os animais em regime de coleta rotineiro três vezes por semana e mantidos sob diretrizes impostas pelo Comitê de Utilização e Cuidados dos Animais da CSU.

Os ejaculados foram coletados com utilização de vagina artificial modelo CSU (Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA). Uma pequena amostra foi diluída a  $50 \times 10^6$  de espermatozoides/mL em EZ-Mixin<sup>®</sup> Basic Formula Extender (Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA) e as motilidades total e progressiva foram determinadas utilizando CASA (Computer Assisted Sperm Analysis; IVOS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA). Se o ejaculado apresentasse motilidade total superior a 60% era então diluído 1:1 em MW e transportado até o laboratório para processamento.

Passados no máximo 45 minutos após a coleta e diluição, o sêmen foi centrifugado a 400 g / 7,5 minutos em tubos cônicos de 15 mL e ressuspendido em MW para concentração aproximada de  $500 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Para cada um dos tratamentos abaixo foram utilizados  $500 \times 10^6$  espermatozoides:

- 1- CT: sêmen sem aditivo;
- 2- CCE: adição de 2 mg de ciclodextrina carregada com estigmastanol /  $120 \times 10^6$  de espermatozoides;
- 3- CCC2: adição de 2 mg de ciclodextrina carregada com colesterol /  $120 \times 10^6$  de espermatozoides;
- 4- CCC4: adição de 4 mg de ciclodextrina carregada com colesterol /  $120 \times 10^6$  de espermatozoides;
- 5- CCC6: adição de 6 mg de ciclodextrina carregada com colesterol /  $120 \times 10^6$  de espermatozoides;
- 6- CCC8: adição de 8 mg de ciclodextrina carregada com colesterol /  $120 \times 10^6$  de espermatozoides.

As amostras foram mantidas por 15 minutos a aproximadamente 22 °C e então centrifugadas em tubos cônicos de 15 mL a 400 g / 10 minutos via 1,5 mL de Percoll 30 % em PBS. O sobrenadante foi aspirado e o pelet ressuspendido em

3 mL de PBS. Uma segunda centrifugação foi feita a 400 g / 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado e 0,7 mL de PBS foram adicionados ao pellet para ressuspensão. A concentração de cada amostra foi mensurada num densímetro (590a, Animal Reproduction Systems) e anotada.

A quantificação de colesterol foi determinada com utilização de Kit de ensaio enzimático Cholesterol Liquicolor (Stanbio Laboratory, Boerne, TX, USA), que combina colesterol oxidase e colesterol esterase (Navratil *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2005a). Para isso o sêmen de cada tratamento foi diluído 1:1 (v:v) em solução 0,4% TritonX-100 em PBS para lisar as membranas espermáticas por uma hora. Cento e cinquenta microlitros de cada amostra foram diluídos em 1 mL do reagente e incubados por 25 minutos a 37 °C. As amostras foram centrifugadas para sedimentação dos debris e o sobrenadante analisado por espectrofotômetro (Spectronic 20D, Milton Roy Company) em comprimento de onda ajustado para 500 nm. As absorbâncias das amostras foram anotadas e comparadas com uma curva padrão de absorbâncias, criada a partir de soluções com quantidades conhecidas de colesterol que acompanha o kit.

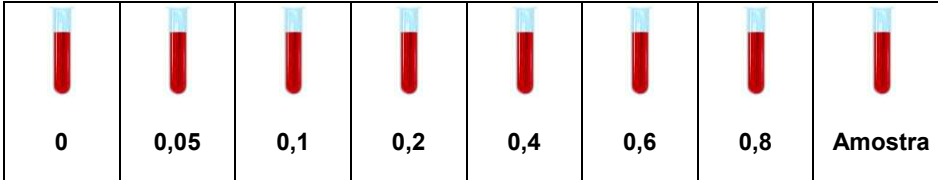
#### **4.2.3. Extração total de fosfolipídeos**

Um mililitro do sêmen diluído em solução 0,4% TritonX-100 (mesmo preparado para análise de colesterol pelo Kit) foi colocado em tubo de vidro (13 x 100 mm). Três mililitros de mistura clorofórfio:metanol (2:1, v:v) e mais 2 mL de metanol foram adicionados às amostras para que se apresentasse em fase única, onde as proteínas começam a se precipitar. As amostras foram agitadas em vortex por 15 segundos, tampadas com papel alumínio e mantidas a 5 °C por 24 horas.

As amostras foram então filtradas em filtro de papel (Whatman 2; 90 mm ø) em funis de vidro em tubos de vidro (18 x 150 mm). Seiscentos microlitros de solução NaCl 0,59% foram adicionados às amostras para dividir a solução em duas fases. Os tubos foram tampados com papel alumínio e mantidos a 5 °C até a

realização do ensaio, quando as amostras se apresentavam em duas fases, sendo a fase inferior a que continha os lipídeos.

A concentração de fosfolipídeos das amostras foi determinada segundo Stewart (1980), pelo método rápido baseado na formação de um complexo entre ferrotiocianato de amônio e fosfolipídeos, que permite quantificação dos últimos em transmitância ajustada para comprimento de onda de 488 nm em solução de clorofórmio. Na Figura 4 é mostrado o esquema de preparação das amostras para realização do ensaio.



	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	Amostra
<b>Solução Padrão</b>	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
<b>Clorofórmio</b>	2 mL	1,95 mL	1,9 mL	1,8 mL	1,6 mL	1,4 mL	1,2 mL	1,9 mL
<b>Solução Controle</b>	0 mL	0,05 mL	0,1 mL	0,2 mL	0,4 mL	0,6 mL	0,8 mL	0 mL
<b>Amostras</b>	0 mL	0 mL	0 mL	0 mL	0 mL	0 mL	0 mL	0,1 mL

**Figura 4:** Esquema da preparação dos tubos para ensaio de ferrotiocianato de amônio e leitura por espectrofotometria. Solução Padrão: 27,03g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 30,4g  $\text{NH}_4\text{SCN}$  em 1L de água deionizada. Solução Controle: 10 mg de 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina em 100 mL de Clorofórmio.

Após preparação, cada tubo foi agitado em vortex por 1 minuto, depois centrifugado por 1 minuto a 15 g para melhor separação das fases. A solução superior foi pipetada e descartada e a camada inferior foi pipetada com pipeta de Pasteur de vidro longa (22 cm) e colocada em cuveta para mensuração da transmitância a comprimento de onda ajustado para 488 nm.

Os valores para os tubos de 0 a 0,8 (prova e contraprova) com quantidades conhecidas de 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-phosphocolina (18:1, Avanti Polar-Lipids, Inc., Alabaster, AL/USA) foram usados para elaboração de uma fórmula por regressão linear, sendo esta usada para se estabelecer as concentrações das amostras.

#### 4.2.4. Análise estatística

As variáveis-dependentes consideradas foram quantidade de colesterol e relação colesterol : fosfolídeos. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) com 5% de probabilidade de erro (Statistical Analysis Systems (SAS); Cary NC, USA).

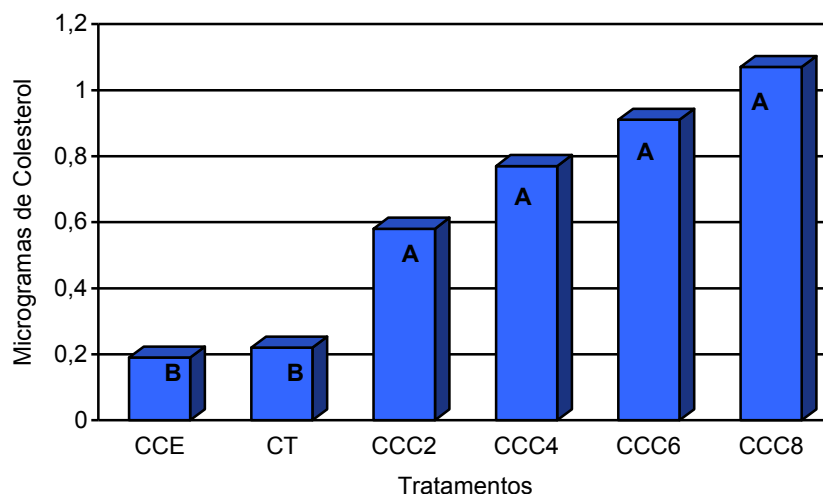
#### 4.3. Resultados e discussão

As quantidades de colesterol das amostras dos diferentes tratamentos foram 0,22; 0,19; 0,58; 0,77; 0,91 e 1,07 microgramas por  $10^6$  de espermatozóides, para o sêmen sem tratamento, tratado com 2 mg de ciclodextrina carregada com estigmastanol e tratado com 2, 4, 6 e 8 mg de ciclodextrina carregada com colesterol, respectivamente (Figura 5).

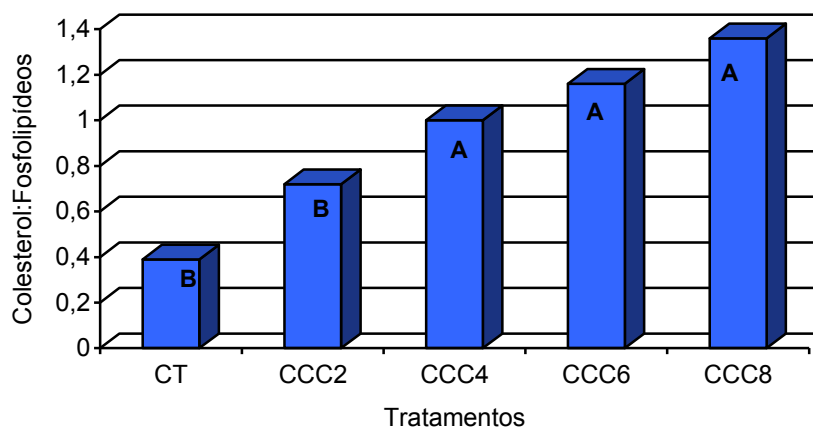
Tratamentos com 2 mg ou mais de CCC foram capazes de aumentar o teor de colesterol nas células espermáticas, não sendo o estigmastanol detectado pelo teste aqui realizado para dosagem do colesterol.

Moore *et al.* (2005a) também tratando sêmen fresco de equino com CCC (0, 0,5, 1,5, 3,0, 4,5, 6,0, ou 7,5 mg) relataram 0,23, 0,34, 0,56, 0,86, 1,03, 1,14, e 1,26 microgramas por  $10^6$  de espermatozóides, respectivamente. Quando 1,5 mg ou mais de CCC foi adicionado, a quantidade de colesterol nos espermatozóides foi maior do que o controle. Resultados estes que corroboram com os encontrados aqui.

Para estabelecer a relação colesterol:fosfolídeos em espermatozóides equinos, cinco ejaculados de diferentes ganhões foram analisados pelo Kit Cholesterol Liquicolor (Stanbio Laboratory, Boerne, TX, USA) e pelo ensaio utilizando ferrotiocianato de amônio. A relação colesterol:fosfolídeos para o sêmen não tratado e tratado com 2, 4, 6 e 8 mg de CCC foram respectivamente 0,39; 0,72; 1,0; 1,16 e 1,36 (Figura 6).



**Figura 5:** Concentração de colesterol ( $\mu\text{g}/10^6$  espermatozoides) na membrana plasmática de células sem aditivo (CT), tratadas com 2 mg de ciclodextrina carregada com estigmastanol/ $120 \times 10^6$  de espermatozoides (CCE), com 2 mg (CCC2), 4 mg (CCC4), 6 mg (CCC6) e 8 mg (CCC8) de ciclodextrina carregada com colesterol/ $120 \times 10^6$  de espermatozoides. <sup>A,B</sup> nas diferentes colunas indicam diferenças entre os tratamentos ( $n=16$ ,  $p<0,05$ ).



**Figura 6:** Relação colesterol:fosfolípidos na membrana plasmática de espermatozoides equinos sem tratamento (CT), ou tratados com 2 mg (CCC2), 4 mg (CCC4), 6 mg (CCC6) e 8 mg (CCC8) de ciclodextrina carregada com colesterol/ $120 \times 10^6$  de espermatozoides. <sup>A,B</sup> nas diferentes colunas indicam diferenças entre os tratamentos ( $n=5$ , 5 garanhões – 1 ejaculado de cada garanhão,  $p<0,05$ ).



O valor encontrado para fosfolipídeos totais nas cinco amostras analisados, em microgramas por  $10^6$  de espermatozóides foram 0,7; 1,0; 0,7; 1,0 e 0,6.

A relação colesterol:fosfolipídeo aqui encontrada está de acordo com o relatado por Parks & Lynch (1992), que relataram 0,36.

O kit comercial utilizado na mensuração de colesterol e o ensaio de ferrotiocianato de amônio são ferramentas bastante simples e úteis, podendo ser utilizados como rotina em laboratórios de reprodução animal, para investigar, por exemplo, a relação colesterol:fosfolipídeos da membrana de espermatozóides de garanhões “maus congeladores”.

#### **4.4. Conclusões**

- O tratamento do sêmen equino com diferentes quantidades de metil- $\beta$ -ciclodextrina carregada com colesterol é capaz de incorporar colesterol à membrana plasmática dos espermatozóides, elevando a relação colesterol:fosfolipídeos das mesmas.

## 5. CAPÍTULO 3

### ALGUNS ASPECTOS SOBRE CAPACITAÇÃO DO SÊMEN EQUINO

#### 5.1. Introdução

A capacitação espermática é um processo essencial para que ocorra a reação acrossômica e a fertilização. Entretanto a diferenciação entre uma célula capacitada e uma não capacitada permanece como uma ciência não exata, apesar deste fenômeno ter sido relatado a mais de 60 anos por Chang (1951) e Austin (1952). Chang trabalhou com coelhos em Massachusetts/EUA e Austin trabalhou com ratos em Sidney/Austrália, e descobriram que a maturação final da célula espermática levava de 2 a 6 horas para ocorrer. Porém, passados todos esses anos, esse processo ainda não se encontra completamente elucidado (Hunter, 2001).

Sabe-se, no entanto, que a capacitação envolve complexos eventos moleculares e bioquímicos, como efluxo de colesterol da membrana plasmática e de sódio da célula, influxo de cálcio para o interior da célula, aumento da concentração de bicarbonato e pH intracelular, aumento da fluidez da membrana plasmática, mudanças no padrão da motilidade, reação acrossomal e ativação da via da adenosina-monofosfato cíclica (cAMP) que resulta na fosforilação da tirosina e proteínas (Cross, 1993; Visconti & Kopf, 1998; Urner & Sakkas, 2003; Escoffier *et al.*, 2012).

Sabendo-se de alguns desses mecanismos, foram desenvolvidas técnicas que permitissem o acompanhamento deste evento que compõe a maturação extratesticular da célula espermática por uso de sondas fluorescentes.

A Merocianina 540 é uma sonda hidrofóbica que cora mais intensamente as membranas que possuem maior estado de desordem de seus componentes, como é o caso dos espermatozóides capacitados. Uma das vantagens da Merocianina 540 é que esta pode ser combinada a um corante impermeável à membrana

plasmática que se liga ao DNA da célula (Yo-Pro-1), permitindo uma análise da viabilidade da célula em conjunto ao estado de sua membrana lipídica. Esta associação de corantes é passível de ser analisada pela técnica de citometria de fluxo (Harrison *et al.*, 1996; Rathi *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2006).

A reação acrossomal, evento requerido para penetração do espermatozóide no ovócito, pode ser avaliada pelo isotiocianato de fluoresceína (FITC), que é uma sonda fluorescente geralmente utilizada para analisar o status acrossomal dos espermatozóides em muitas espécies (Cross *et al.*, 1986; Farlin *et al.*, 1992; Sukardi *et al.*, 1997; Peña *et al.*, 1999). FITC é ligado a uma lectina isolada da semente de plantas que especificamente liga aos resíduos de açúcar (Trowbridge, 1974). Aglutinina de *Pisum sativum* (PSA, aglutinina da ervilha) e aglutinina de *Arachis hypogaea* (PNA, aglutinina do amendoim) são usadas para determinar a integridade do acrossoma (Graham, 2001).

O CoroNa Green é um indicador de íons de sódio permeáveis à membrana celular que exhibe aumento em intensidade de emissão de fluorescência verde quando se liga ao íon  $\text{Na}^+$ . Tal como outros indicadores de sódio (SBFI e Sodium Green, por exemplo), o indicador CoroNa Green permite resolução espacial e temporal de amplas concentrações de  $\text{Na}^+$  na presença de concentrações fisiológicas de outros cátions monovalentes.

Fluo-3 é um indicador de fluorescência de cálcio utilizado para medir  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de células vivas em citometria de fluxo e microscopia confocal de varrimento a laser usando excitação da luz visível. Fluo-3 é essencialmente um composto não fluorescente, mas após sua ligação com íons  $\text{Ca}^{2+}$  há aumento nítido na sua fluorescência, com máximo de emissão a 525 nm, podendo ser captada por detectores utilizados convencionalmente para medições de FITC. Esta grande mudança na fluorescência juntamente com bom rendimento de fótons fornece um contraste muito alto, que permite a detecção de eventos intracelulares de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , chamados de "faíscas de cálcio" (Cheng *et al.*, 1993).

O iodeto de propídio (PI) é uma sonda que possui afinidade pelo DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada, e vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da

técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana, seja isoladamente ou associado a outro corante fluorescente para avaliar membrana plasmática ou dinâmica de íons (Graham *et al.*, 1990; Maxwell *et al.*, 1997; Arruda, 2000; Arruda, *et al.*, 2003; Celeguini, 2005).

Falando em capacitação espermática não se pode deixar de mencionar o plasma seminal, que é uma mistura de secreções produzidas nos testículos, epidídimos e pelas glândulas sexuais acessórias, e tem múltiplas funções que envolvem os eventos que precedem a fertilização (Kareskoski & Katila, 2008).

Os fluidos epididimários e seminal têm sido considerados como inibidores da capacitação por inserirem fatores decapacitantes na superfície espermática, os quais previnem que os espermatozóides respondam adequadamente ao estímulo da capacitação.

Por outro lado, se o plasma seminal tem agentes decapacitantes, é intensa a busca por compostos que tornem as células espermáticas capazes de fertilizarem ovócitos *in vitro*.

Graham *et al.* (1986), testaram dicaproilfosfatidilcolina (PC-10), dilaurilfosfatidilcolina (PC-12), dimiristoilfosfatidilcolina (PC-14), dipalmitoilfosfatidilcolina (PC-16), distearoilfosfatidilcolina (PC-18) e diaracidoilfosfatidilcolina (PC-20) como indutores de reação acrossômica em espermatozóides bovinos, e demonstraram que o tratamento com lipossomos compostos de dilauoilfosfatidilcolina (PC-12) foi capaz de induzir reação acrossômica e tornar as células espermáticas capazes de se ligarem à ovócitos de hamster.

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento de íons sódio e cálcio intracelular, organização de membrana plasmática e reação acrossômica de espermatozóides nos tempos 0, 5, 15 e 30 minutos de incubação, tratados ou não com plasma seminal ou PC-12.

## **5.2. Material e métodos**

### **5.2.1. Preparação do dilauroilfosfatidilcolina (PC-12)**

Lipossomos compostos de dilauroilfosfatidilcolina (PC-12) foram preparados segundo descrito por Nolan *et al.* (1992). Para isto, solução de PC-12 (Sigma P1534) a 10 mg/mL em clorofórmio foi adicionada a um tubo de vidro (18 x 150 mm), e o solvente removido por corrente de gás nitrogênio até completa secagem. Doze mililitros de MW foram adicionados ao tubo, e os lipossomos formados por sonicação por 5 minutos (Brason Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, equipado com conversor CE 102C).

A solução foi então aliqüotada (0,5 mL em criotubos de 1 mL) e estocada a -20 °C até utilização. A concentração de fosfolípidos da solução foi determinada utilizando-se ensaio de ferrotiocianato de amônio (Stewart, 1980), como descrito no Capítulo 2. Sabendo-se que o peso molecular do PC-12 é 622 se converte o valor encontrado na unidade mg/mL para  $\mu\text{M}$  (divide-se o valor encontrado em mg/mL por 622 e chega-se ao valor em M, que multiplicado por  $10^6$  converte-se para  $\mu\text{M}$ ).

### **5.2.2. Coleta e preparação do sêmen**

Sêmen de cinco garanhões com idade entre 15 e 21 anos, das raças Puro-Sangue Inglês, Quarto de Milha e Árabe; estabelecidos no Laboratório de Reprodução Equina da Universidade Estadual do Colorado (CSU, Fort Collins-CO, USA) foram utilizados neste estudo, estando os animais em regime de coleta rotineiro três vezes por semana e mantidos sob diretrizes impostas pelo Comitê de Utilização e Cuidados dos Animais da CSU.

Os ejaculados foram coletados com utilização de vagina artificial modelo CSU (Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA). Uma pequena amostra foi diluída a  $50 \times 10^6$  de espermatozoides/mL em EZ-Mixin<sup>®</sup> Basic Formula Extender

(Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA), e as motilidades espermáticas total e progressiva foram determinadas utilizando CASA (Computer Assisted Sperm Analysis; IVOS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA). Ejaculados apresentando motilidade total superior a 60% foram diluídos 1:1, em meio MW, e transportado até o laboratório para processamento.

Passado no máximo 45 minutos após a coleta e diluição, o sêmen foi centrifugado a 400 g / 7,5 minutos em tubos cônicos de 15 mL e ressuspendido para aproximadamente  $600 \times 10^6$  espermatozoides / mL em MW.

O sêmen foi dividido em três tratamentos:

- 1- Controle (CT): sêmen sem aditivos;
- 2- Plasma Seminal (PS): adição de 20% de plasma seminal equino previamente adquirido por centrifugação vigorosa de sêmen sem adição de diluidor (1000 x g / 30 min) e estocado a -20 °C;
- 3- PC-12 (PC): adição de 40  $\mu$ M de PC-12.

Cada um dos tratamentos acima citados foi submetido a quatro diferentes corantes:

- 1- Corona Green (CG; CoroNa™ Green, Molecular Probes®), que quantifica sódio intracelular;
- 2- Fluo-3 (Fluo), que quantifica cálcio intracelular;
- 3- FITC-PNA (FP); que quantifica reação acrossômica;
- 4- Merocianina (Mero); que caracteriza fuidez / desorganização da membrana plasmática.

Para isso foram preparados quatro diferentes tubos com 2 mL de meio MW para uma primeira diluição, onde as células foram coradas (com exceção da Merocianina, que foi adicionado na segunda diluição):

- 1- CG: 2,5  $\mu$ L de CoroNa Green + 2,5  $\mu$ L de Iodeto de Propídeo;
- 2- Fluo: 2,5  $\mu$ L de Fluo-3 + 2,5  $\mu$ L de Iodeto de Propídeo;
- 3- FP: 2,5  $\mu$ L de FITC-PNA + 2,5  $\mu$ L de Iodeto de Propídeo;
- 4- Mero: somente MW

Em cada tubo foram colocados  $50 \times 10^6$  espermatozoides, resultando numa concentração bem próxima a  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL. A partir daí o tempo foi cronometrado e em 15 minutos (Tempo 0 - T0), 0,4 mL de cada amostra foram transferidos para um segundo tubo contendo 1 mL de MW (concentração final próxima a  $7 \times 10^6$  espermatozoides/mL), sendo que o tubo para avaliação de Mero continha além de MW, 1  $\mu$ L de Merocianina + 1  $\mu$ L de Yo-Pro-1.

A adição de plasma seminal e PC-12 ao sêmen foi realizada no T0, e aí então o sêmen foi transferido para o segundo tubo. As amostras alocadas no segundo tubo foram então analisadas em citometria de fluxo para quantificação dos corantes no interior dos espermatozoides, sendo as amostras para Mero lidas exatos 75 segundos após a adição do sêmen ao corante. As amostras do primeiro tubo foram encubadas a 37 °C e o mesmo procedimento citado foi repetido nos tempos 5 (T5), 15 (T15) e 30 (T30) minutos.

### **5.2.3. Análise estatística**

Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) com 5% de probabilidade de erro (Statistical Analysis Systems (SAS); Cary NC, USA).

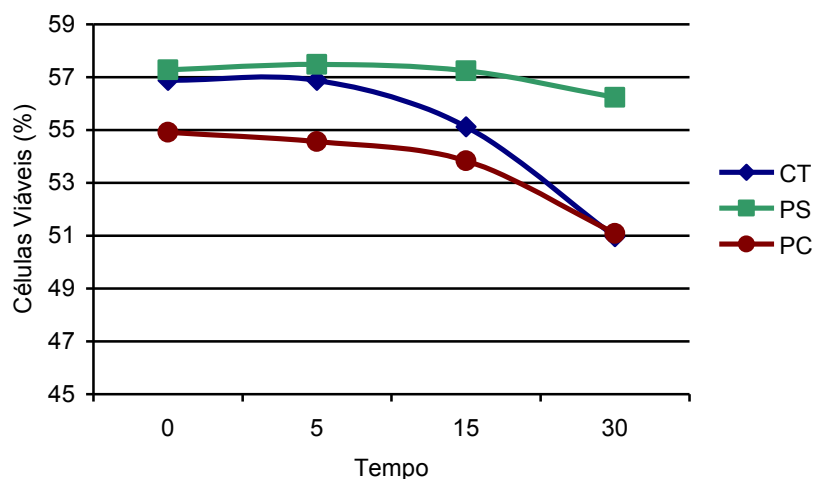
### **5.3. Resultados e discussão**

O processo de capacitação espermática é um processo complexo, e uma melhor compreensão de como a membrana plasmática é organizada e se comporta durante este fenômeno é importante na compreensão de como o espermatozoide e o ovócito normalmente se interagem antes da fertilização.

Não houve diferença no percentual de células viáveis entre os diferentes tratamentos, nem entre um mesmo tratamento ao longo do tempo. Isso mostra

que as etapas decorridas ao longo da incubação e das avaliações das amostras não causaram danos à membrana dos espermatozoides (Figura 7).

Com relação à reação acrossômica, o tratamento com PC-12 aumentou o percentual de células com acrossoma reagido, detectada na avaliação aos 30 minutos. Este percentual, de 33,4%, foi maior que o dos demais tratamentos no mesmo tempo (CT: 13% e PS: 4,2%) e foi superior aos percentuais para o próprio PC-12 nos tempos 0 (7%), 5 (9%) e 15 (16,2%, Figura 8).



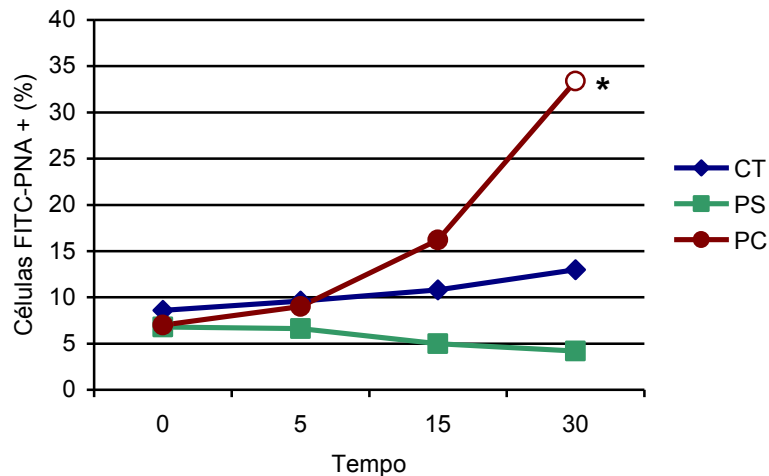
**Figura 7:** Percentual de células viáveis para sêmen equino fresco sem tratamento (CT), tratado com 20% de plasma seminal (PS) ou com PC-12 40  $\mu$ M (PC) ao longo do período de incubação ( $p > 0,05$ ,  $n = 5$ , 5 garanhões - 1 ejaculado de cada garanhão).

Spizziri *et al.* (2010b) também relataram indução de reação acrossômica em sêmen equino congelado após incubação por 25 minutos em meio com PC-12 a 54  $\mu$ M. O PC-12 é um lipídeo fusogênico que desestabiliza a membrana plasmática por induzir rearranjos de colesterol na membrana, e em concentrações suficientemente altas é capaz de induzir reação acrossômica em espermatozoides de várias espécies, criando condições para capacitação (Graham *et al.*, 1987; Nolan *et al.*, 1992; Graham, 1996,2001; Landim-Alvarenga *et al.*, 2001,2004; Spizziri *et al.*, 2010b).

Com relação à fluidez da membrana plasmática não houve diferença no percentual de células com merocianina elevada entre os diferentes tratamentos,



nem entre um mesmo tratamento ao longo do tempo. O comportamento demonstrado pelo sêmen sem tratamento seria esperado no sêmen tratado com PC-12, pelo fato deste agir diretamente sobre a membrana, desorganizando-a, mas o comportamento do sêmen tratado com PC-12 e plasma seminal foram semelhantes (Figura 9)..

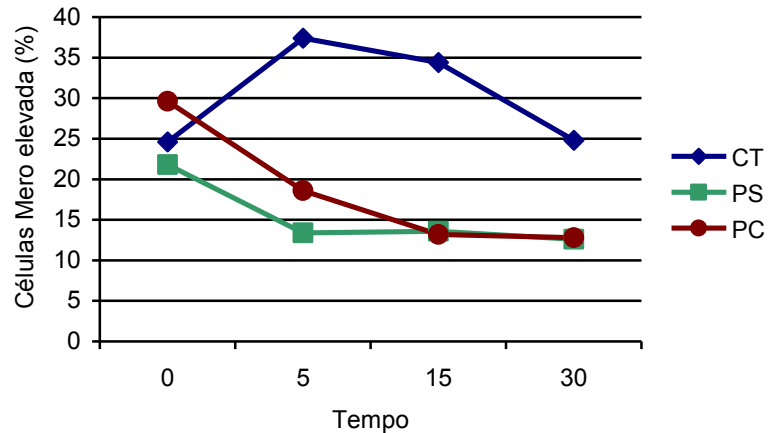


**Figura 8:** Percentual de células viáveis com acrossoma reagido para sêmen equino fresco sem tratamento (CT), tratado com 20% de plasma seminal (PS) ou com PC-12 40  $\mu$ M (PC) ao longo do período de incubação. \* indica diferença entre tratamentos e o controle num mesmo tempo ( $p < 0,05$ ). Ponto de dado em branco indica diferença com tempo 0 dentro de um mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ,  $n = 5$ , 5 garanhões - 1 ejaculado de cada garanhão).

No presente estudo foi caracterizado o efluxo de sódio das células espermáticas equinas viáveis após 15 minutos de incubação, sendo que nos tempos 15 e 30 minutos o percentual de células positivas para CG foram menores para tratamento com plasma seminal (8,8 e 4,8 %) e maiores para tratamento com PC-12 (36 e 15,4%), em relação ao controle (23,6 e 11,8%,  $p < 0,05$ , Figura 10). Isso demonstra que apesar do sêmen dos diferentes tratamentos apresentarem o mesmo comportamento em relação ao CG, o tratamento com plasma seminal permitiu uma saída mais rápida de sódio das células, e o PC-12 retardou esse evento.

Escoffier *et al.* (2012), trabalhando com camundongos, relataram diminuição na fluorescência de CoroNa Red, que também se liga ao íon  $\text{Na}^+$ , em

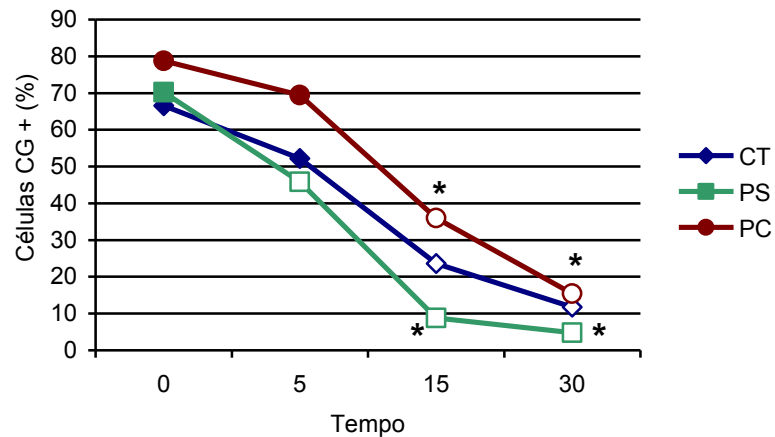
espermatozoides capacitados, se comparado a espermatozoides não capacitados. Estes autores utilizaram dois diferentes meios de incubação, um sem adição de BSA e  $\text{HCO}_3^-$  (que não proporciona capacitação) e outro contendo BSA e  $\text{HCO}_3^-$  (que proporciona capacitação, semelhante ao aqui utilizado), e relataram efluxo de sódio em células íntegras incubadas por 1 hora em meio para capacitação.



**Figura 9:** Percentual de células viáveis com merocianina elevada para sêmen equino fresco sem tratamento (CT), tratado com 20% de plasma seminal (PS) ou com PC-12 40  $\mu\text{M}$  (PC) ao longo do período de incubação ( $p > 0,05$ ,  $n = 5$ , 5 garanhões - 1 ejaculado de cada garanhão).

Outro resultado da capacitação é o aumento na permeabilidade da membrana ao cálcio, o que permite a rápida circulação de cálcio no citoplasma do espermatozoide. Este influxo de cálcio é necessário para que haja fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa, dando início à reação acrossômica (Yanagimachi & Usui, 1974; Talbot *et al.*, 1976; Singh *et al.*, 1978; Triana *et al.*, 1980). O cálcio entra no espermatozoides de um modo bifásico, com pequena elevação inicial do cálcio intracelular durante a capacitação, seguido por elevação maior, que ocorre no momento da reação acrossômica (DasGupta *et al.*, 1993; Adeoya-Osifuwa & Fraser, 1993; Florman, 1994).

No presente estudo, após 15 minutos de incubação o sêmen dos três tratamentos apresentou percentual de células positivas para Fluo superior ao tempo 0, porém o plasma seminal retardou um pouco a entrada deste íon nas células, visto que, no T15 percentual de células positivas para Fluo foi menor que nos outros tratamentos, voltando a se igualar no tempo 30 minutos (Figura 11).



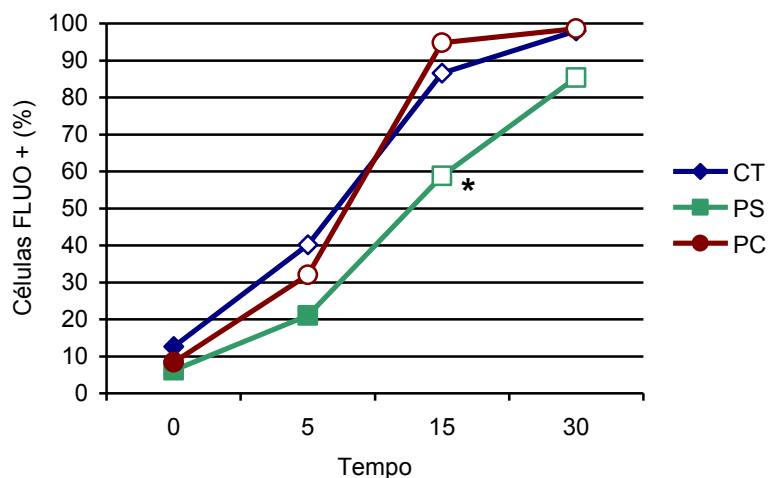
**Figura 10:** Percentual de células viáveis positivas para CoroNa Green no sêmen equino fresco sem tratamento (CT), tratado com 20% de plasma seminal (PS) ou com PC-12 40 µM (PC) ao longo do período de incubação. \* indica diferença entre tratamentos e o controle num mesmo tempo ( $p < 0,05$ ). Pontos de dados em branco indicam diferença com tempo 0 dentro de um mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ,  $n = 5$ , 5 garanhões - 1 ejaculado de cada garanhão).

Landim-Alvarenga *et al.* (2004), também utilizando Fluo-3 para avaliar entrada de cálcio em células espermáticas equinas antes e após congelamento, não detectaram aumento no percentual de células com cálcio elevado no sêmen sem tratamento ou tratado com 100 µM de PC-12 durante incubação por 30 minutos. Porém relataram aumento nesse percentual em sêmen tratado com 100 nM de cálcio ionóforo A23187 já no primeiro minuto de incubação, tanto para sêmen fresco quanto para sêmen após descongelamento.

McPartlin *et al.* (2008) trabalhando com incubação de espermatozoides equinos no mesmo meio diluidor aqui utilizado, por 4-6 horas, concluíram que as condições proporcionadas pelo meio induziram altas taxas de reação acrossômica

após tratamento com progesterona (45%) ou cálcio ionóforo (52%), se comparado a espermatozóides incubados no mesmo meio, sem adição de BSA e  $\text{NaHCO}_3$ .

O meio MW aqui utilizado foi capaz por si só, de causar efluxo de sódio e influxo de cálcio, alterações que caracterizam capacitação espermática. Com relação ao plasma seminal, Makler *et al.* (1984) e Jasko *et al.* (1991) relataram diminuição na motilidade espermática quando espermatozóides humanos e equinos foram incubados com altas proporções de plasma seminal por até 24 h. Já Aurich *et al.* (1996) e Katila *et al.* (2002) não relataram qualquer efeito prejudicial do plasma seminal na sobrevivência espermática após descongelamento. Analisaram a motilidade apenas 10 minutos após o descongelamento e, portanto, quaisquer efeitos prejudiciais em longo prazo do plasma seminal podem não ter sido observados.



**Figura 11:** Percentual de células viáveis positivas para Fluo no sêmen equino fresco sem tratamento (CT), tratado com 20% de plasma seminal (PS) ou com PC-12 40  $\mu\text{M}$  (PC) ao longo do período de incubação. \* indica diferença entre tratamentos e o controle num mesmo tempo ( $p < 0,05$ ). Pontos de dados em branco indicam diferença com tempo 0 dentro de um mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ,  $n = 5$ , 5 garanhões - 1 ejaculado de cada garanhão).

No mesmo sentido, Moore *et al.* (2005b) avaliaram presença de 5% e 20% de plasma seminal no meio de congelamento para garanhões, e não observaram efeitos prejudiciais 10 minutos após o descongelamento, mas as amostras com

maior proporção de plasma seminal (20%) apresentaram percentagens inferiores de células móveis 90 minutos após o descongelamento.

No presente estudo não se avaliou motilidade espermática ao longo da incubação por 30 minutos, mas este tempo foi suficiente para demonstrar algumas diferenças no comportamento do cálcio, sódio e reação acrossômica durante incubação do sêmen tratado com plasma seminal a 20%, como descrito anteriormente.

#### **5.4. Conclusões**

- Tratamento com PC-12 (40  $\mu$ M) é capaz de induzir reação acrossômica em espermatozoides equinos incubados por 30 minutos em meio MW.

- A incubação do sêmen equino em meio MW é capaz de induzir efluxo de sódio e influxo de cálcio nas células espermáticas, alterações que caracterizam a capacitação.

- O plasma seminal em concentração de 20% retarda o influxo de cálcio e acelera o efluxo de sódio em células espermáticas incubadas em meio MW.

## 6. CAPÍTULO 4

### UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DILUIDORES E TEMPOS DE RESFRIAMENTO NO CONGELAMENTO DE SÊMEN EQUINO

#### 6.1. Introdução

Quando os espermatozóides equinos são resfriados de aproximadamente 20 °C até 5-8 °C sua membrana plasmática passa por uma fase de transição, de estado fluido para estado gel (Hammerstedt *et al.*, 1990). Se esse resfriamento for realizado de forma rápida pode induzir “choque pelo frio”, um dano parcialmente irreversível ao espermatozóide que se caracteriza por rápida perda de motilidade, movimento circular anormal, redução do metabolismo, perda de moléculas intracelulares e danos acrossomais (Watson, 1981; Amann & Graham, 1993).

Para minimizar os efeitos do choque pelo frio, lipídeos (gema de ovo ou leite integral) e/ou lipoproteínas (leite desnatado) são adicionados ao sêmen antes do resfriamento, e os espermatozóides são resfriados lentamente durante a faixa de temperatura em que a membrana lipídica passa pela fase de transição (Moran *et al.*, 1992; Graham, 1996).

Outros crioprotetores (penetrantes e não penetrantes) são adicionados ao diluidor de congelamento. Os penetrantes são aqueles que têm a capacidade de atravessar a membrana plasmática dos espermatozóides devido a seu peso molecular, atuando, assim, nos meios intra e extracelular. Estes atuam por de suas propriedades coligativas, reduzindo a temperatura de congelamento intracelular. Desta forma, maior quantidade de água vai permanecer no estado líquido quando a célula espermática for submetida a baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular de solutos e proporcionando, assim, ambiente menos deletério durante o congelamento e desidratação mais lenta da célula espermática (Watson, 1995).

O glicerol é o crioprotetor penetrante mais comumente utilizado nos meios de congelamento de sêmen de garanhões desde o nascimento do primeiro potro resultado do uso de sêmen congelado com glicerol (concentração final de 10%) em abril de 1956 (Barker & Gandier, 1957). As concentrações mais utilizadas variam de 2 a 5% (Keith, 1998; Vidament *et al.*, 2000).

Na pesquisa por outros crioprotetores alternativos para o congelamento do sêmen equino, várias amidas (formamida, metilformamida, dimetilformamida, acetamida e metilacetamida) foram avaliadas como agentes crioprotetores isolados ou em associação com o glicerol. Em geral as amidas possuem peso molecular menor que o glicerol (92 g/mol) e induzem menos danos osmóticos aos espermatozóides (Ashwood-Smith, 1987).

Hoffmann *et al.* (2010) trabalhando com glicerol, etilenoglicol, dimetilformamida e metilformamida isoladamente como crioprotetores concluíram que 2 ou 3% (600-950 mOsm) foram as melhores concentrações desses crioprotetores para se manter motilidade progressiva, e 2% (600-750mOsm) foi a melhor concentração para se manter a viabilidade da célula espermática.

Segundo Gomes *et al.* (2002) em sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, resultados superiores de motilidade total e integridade de membrana foram alcançados com a utilização da metilformamida e dimetilformamida em comparação ao glicerol (todos a 5%).

Gibb *et al.* (2013) observaram aumento na motilidade espermática total e diminuição da fragmentação do DNA quando se utilizou a dimetilformamida em substituição ao glicerol. Ainda, observaram viabilidade espermática decrescente com utilização de 2, 3 e 4% tanto da dimetilformamida quanto do glicerol.

Papa *et al.* (2002), associando dimetilformamida e glicerol (diluidor MP50), proporcionaram melhora na proteção da célula espermática durante o congelamento. Dalimata & Graham (1997) ressaltam que o uso combinado de crioprotetores confere maior proteção do que o uso isolado, e as combinações qualitativas e quantitativas são inúmeras, dadas a quantidade de compostos utilizados como crioprotetores.

Comparando-se os pesos moleculares da dimetilformamida e da metilformamida, a última apresenta menor peso molecular (73 g/mol vs. 59 g/mol), e teoricamente seria menos nociva aos espermatozóides.

O diluidor lactose-EDTA (Martin et al, 1979; Cochran *et al.*, 1984; Cristanelli *et al.*, 1985) é comumente utilizado no congelamento de sêmen equino. Uma das razões dessa popularidade é o protocolo utilizado, sem necessidade de resfriamento lento do sêmen de 20 °C a 5 °C, sendo os espermatozóides envasados em palhetas à temperatura próxima a 20 °C e congelados imediatamente, tanto no vapor de nitrogênio em caixas de isopor como em congeladores automáticos programáveis.

Assim sendo, os objetivos neste trabalho foram: 1- avaliar eficiência de diluidores a base de gema de ovo e gema de ovo associada a leite desnatado, ambos contendo 5% de glicerol; 2- avaliar eficiência da combinação da metilformamida com glicerol e 3- avaliar diferentes métodos de resfriamento antes do congelamento sobre motilidades total e progressiva.

## **6.2. Material e métodos**

### **6.2.1. Coleta e preparação do sêmen**

Sêmen de cinco garanhões com idade entre 15 e 21 anos, das raças Puro-Sangue Inglês, Quarto de Milha e Árabe; estabulados no Laboratório de Reprodução Equina da Universidade Estadual do Colorado (CSU) foram utilizados neste estudo, estando os animais em regime de coleta rotineiro três vezes por semana e mantidos sob diretrizes impostas pelo Comitê de Utilização e Cuidados dos Animais da CSU.

Os ejaculados foram coletados com utilização de vagina artificial modelo CSU (Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA). Uma pequena amostra foi diluída a  $50 \times 10^6$  de espermatozóides/mL em EZ-Mixin<sup>®</sup> Basic Formula Extender (Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA) e a motilidade total e progressiva



foram determinadas utilizando CASA (Computer Assisted Sperm Analysis; IVOS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA). Ejaculados apresentando motilidade total superior a 60% foram diluídos 1:1 em meio MW (diluidor de Whitten modificado; Anexo 8.1) e transportado até o laboratório para processamento.

Passado no máximo 45 minutos após a coleta e diluição o sêmen foi centrifugado a 400 g / 7,5 minutos em tubos cônicos de 15 mL e ressuspendido para  $50 \times 10^6$  espermatozoides / mL em três diferentes diluidores de congelamento: 1- FR5 modificado (FR5M 5% glicerol, Anexo 8.2); 2- Lactose-EDTA (5% glicerol) e 3- Lactose-EDTA (3% metilformamida + 2% glicerol, Anexo 8.3). Para cada um dos diluidores o sêmen foi fracionado e submetido a diferentes tratamentos antes do congelamento:

- 1- 0: envase do sêmen em palhetas de 0,5 mL a 22 °C e congelamento sem resfriamento;
- 2- 20: envase do sêmen em palhetas de 0,5 mL a 22 °C e resfriamento das palhetas por 20 minutos a 5 °C em rampa de congelamento antes da criopreservação;
- 3- 120T: resfriamento do sêmen em tubos de vidro 13 x 100 mm (selados com parafilme) inseridos em becker de 150 mL contendo 100 mL de água a 22 °C por 120 minutos a 5 °C;
- 4- 120P: resfriamento do sêmen em palhetas de 0,5 mL inseridas em recipiente contendo 300 mL de água a 22 °C por 120 minutos a 5 °C.

O resfriamento a 5 °C foi realizado em sala refrigerada, de forma a permitir manutenção da temperatura durante o envase do sêmen resfriado em tubos ou colocação das palhetas resfriadas por 120 minutos na rampa de congelamento.

O congelamento foi realizado colocando-se as palhetas a 7 cm do nível de nitrogênio em rampa flutuante por 15 minutos (-60 °C/min; Cochran *et al.*, 1984; Cristanelli *et al.*, 1985; Pickett *et al.*, 1987), quando então foram imergidas em nitrogênio líquido, raqueadas e colocadas em canisters para armazenamento nos botijões.

### **6.2.2. Análise da motilidade espermática**

Duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas a 37 °C por 30 segundos e seus conteúdos homogeneizados em um tubo de vidro para avaliação da motilidade espermática utilizando CASA (Computer Assisted Sperm Analysis; IVOS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA).

Uma gota de 6,5 µL do sêmen de cada tratamento foi colocada em uma lâmina para microscopia Cell-Vu (Millennium Sciences, Inc., New York) a 37 °C, e pelo menos 400 espermatozóides foram analisados por amostra.

As características foram ajustadas da seguinte maneira no Animal Motility: 30 imagens adquiridas (image capture: nº of frames); 60 imagens / seg (image capture: frames per sec.); contraste mínimo da célula: 80 (cell detection: minimum contrast); tamanho mínimo da célula: 3 pixels (cell detection: minimum cell size); tamanho para células imóveis: 5 pixels (defaults: cell size); intensidade para células imóveis : 110 (defaults: cell intensity); referência de VAP para células progressivas: 50,0 µm/seg (progressive cells: path velocity – VAP); referência de STR para células progressivas: 75,0% (progressive cells: straightness – STR); referência de velocidade de trajeto - VAP para células lentas: 20,0 µm/seg (slow cells: VAP cutoff); referência de velocidade progressiva - VSL para células lentas: 0 µm/seg (slow cells: VSL cutoff).

### **6.2.3. Análise estatística**

Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) com 5% de probabilidade de erro (Statistical Analysis Systems-SAS; Cary NC, USA).

### 6.3. Resultados e discussão

FR5M e lactose-EDTA com 5% de glicerol apresentaram motilidade espermática total superiores à lactose-EDTA com 3% metilformamida + 2% glicerol ( $p < 0,05$ ) e iguais entre si ( $p > 0,05$ ) em todos os diferentes métodos de resfriamento. Quanto à motilidade espermática progressiva, o FR5M foi superior à lactose-EDTA (independente do crioprotetor;  $p < 0,05$ ) em todos os diferentes métodos de resfriamento (Tabelas 7 e 8).

Se comparado o efeito do crioprotetor utilizado nas amostras de sêmen, a utilização de 5% de glicerol preservou melhor a motilidade espermática progressiva que a combinação de metilformamida e glicerol em sêmen resfriado a 5 °C por 120 minutos (seja em tubos ou em palhetas;  $p < 0,05$ ). Porém esses valores foram semelhantes ( $p > 0,05$ ) para sêmen sem resfriamento e também para o sêmen resfriado por 20 minutos a 5 °C (Tabelas 7 e 8).

Avaliando os diferentes métodos de resfriamento, a motilidade espermática total foi superior quando se resfriou o sêmen por 20 min a 5 °C se comparado ao sêmen congelado sem resfriamento prévio, tanto para o FR5 quanto para lactose-EDTA com 5% glicerol ( $p < 0,05$ ). Para lactose-EDTA com metilformamida + glicerol não houve diferença entre os dois métodos ( $p > 0,05$ ). Com relação à motilidade espermática progressiva houve diferença ( $p < 0,05$ ) apenas quando da utilização da lactose-EDTA com 5% glicerol (Tabela 7).

**Tabela 7:** Percentual de motilidade total (MT) e progressiva (MP) de espermatozóides criopreservados em três diferentes diluidores (FR5M 5% glicerol, Lactose-EDTA 5% glicerol e Lactose-EDTA 3% metilformamida + 2% glicerol) resfriados por 0 ou 20 minutos a 5 °C antes do congelamento.

Tempo	FR5M (5%GLI)		Lactose (5%GLI)		Lactose (3%MF + 2% GLI)	
	MT (%)	MP (%)	MT (%)	MP (%)	MT (%)	MP (%)
0	39 <sup>A</sup>	15 <sup>A</sup>	33 <sup>A</sup>	9 <sup>B</sup>	20 <sup>B</sup>	5 <sup>B</sup>
20	49 <sup>A*</sup>	21 <sup>A</sup>	45 <sup>A*</sup>	14 <sup>B*</sup>	30 <sup>B</sup>	9 <sup>B</sup>
EPM	3,6	2,1	3,2	1,3	3,2	1,3

<sup>A,B</sup> sobrescritos na mesma linha indicam diferenças entre diluidores ( $p < 0,05$ ). \* sobrescrito na mesma coluna indica diferença entre tempos de resfriamento ( $p < 0,05$ ,  $n=14$ , 5 garanhões - 4,3,3,2,2 ejaculados).

Com relação ao resfriamento por 120 minutos a 5 °C, não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os dois métodos utilizados em nenhum dos meios diluidores testados, sendo os valores aqui encontrados bem superiores, se comparados aos do sêmen sem resfriamento. Por exemplo, a motilidade total foi cerca de 20% superior para FR5M e lactose-EDTA 5% glicerol e 15% superior quando se utilizou lactose-EDTA com metilformamida + glicerol (comparando-se 0 com 120 minutos).

**Tabela 8:** Percentual de motilidade total (MT) e progressiva (MP) de espermatozóides criopreservados em três diferentes diluidores (FR5M 5% glicerol, Lactose-EDTA 5% glicerol e Lactose-EDTA 3% metilformamida + 2% glicerol) resfriados por 120 minutos a 5 °C em tubos (120T) ou palhetas (120P) antes do congelamento.

Tempo	FR5M (5%GLI)		Lactose (5%GLI)		Lactose (3%MF + 2% GLI)	
	MT (%)	MP (%)	MT (%)	MP (%)	MT (%)	MP (%)
<b>120T</b>	61 <sup>A</sup>	26 <sup>A</sup>	56 <sup>A</sup>	19 <sup>B</sup>	35 <sup>B</sup>	11 <sup>C</sup>
<b>120P</b>	58 <sup>A</sup>	25 <sup>A</sup>	53 <sup>A</sup>	17 <sup>B</sup>	36 <sup>B</sup>	10 <sup>C</sup>
<b>EPM</b>	3,5	2,3	3,8	1,8	4,0	1,7

<sup>A,B,C</sup> sobrescritos na mesma linha indicam diferenças entre tratamentos ( $P<0,05$ ). (n=18; 5 garanhões - 6,5,4,2,1 ejaculados).

Isso mostra que o resfriamento em palhetas de 0,5 mL também pode ser utilizado sem prejuízo às motilidades espermáticas total e progressiva em laboratórios que utilizam resfriamento de sêmen em tubos, com posterior envasamento do sêmen no interior de uma sala refrigerada. Isso diminui o tempo de permanência do profissional à temperatura de 5°C, uma vez que o envazamento do sêmen nas palhetas pode ser realizado à temperatura ambiente.

Moore *et al.* (2006) também trabalharam com diluidor de congelamento a base de leite em pó e gema de ovo (EZ-Freezin' "FR5M," Animal Reproduction Systems) e testaram diferentes crioprotetores a 4% (glicerol, etilenoglicol e dimetilformamida). Os autores resfriaram as palhetas em banho-maria com 100 mL por 2 horas em sala refrigerada e depois submeteram o sêmen a diferentes taxas de congelamento dos 5 °C a -120 °C (-5°C/min; -10°C/min; -15°C/min; -20°C/min; -25°C/min; -30°C/min; -35°C/min; -40°C/min; -45°C/min ou -50°C/min) e concluíram que o glicerol foi mais eficiente na manutenção de

motilidades espermáticas total e progressiva em todas as diferentes taxas de congelamento.

García *et al.* (2012), avaliando efeito de 0; 0,5; 1,5; 2,5; 3,5 e 5% de glicerol na integridade de membrana plasmática, no citoesqueleto, na peroxidação de lipídeos, no potencial de membrana mitocondrial e volume celular, concluíram que após incubação por 60 minutos, concentração de 5% foi capaz de aumentar o volume celular, diminuir integridade de membrana e presença de actina-F no citoesqueleto. Os autores recomendaram utilização de no máximo 2,5% de glicerol para evitar esses danos aos espermatozóides equinos.

No presente estudo a utilização de 2% de glicerol em associação a 3% de metilformamida não mostrou melhora nas motilidades espermáticas total e progressiva. Trabalhando com amidas sem associação ao glicerol, Medeiros *et al.* (2002) observaram melhora na motilidade espermática total com a utilização de dimetilformamida a 5% e metilformamida a 5%, quando comparado ao glicerol a 5%. No mesmo sentido, Gomes *et al.* (2002) relataram, trabalhando com sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, resultados superiores de motilidade espermática total e integridade de membrana com a utilização da metilformamida e dimetilformamida a 5% em comparação ao glicerol. Alvarenga (2003) estudou as variações de congelabilidade entre 55 garanhões de diferentes raças (Mangalarga Marchador, Campolina, Puro-Sangue-Inglês, Quarto-de-Milha, Árabe e Lusitano) utilizando os crioprotetores dimetilformamida e glicerol (ambos a 5%), e constatou que os parâmetros de motilidade total e progressiva foram superiores com uso de dimetilformamida, na maioria dos garanhões (40 dos 55 animais).

A utilização da metilformamida e outros crioprotetores pode ser uma alternativa para aqueles garanhões que apresentam resultados insatisfatórios com uso do glicerol, mas não mostrou benefícios nas motilidades no presente estudo.

#### **6.4. Conclusões**

- O meio de congelamento FR5M modificado preserva melhor a motilidade espermática progressiva após descongelamento, mostrando benefício da combinação da gema de ovo de galinha com leite em pó no diluente de congelamento.

- A utilização de lactose-EDTA com 5% de glicerol preserva motilidades espermáticas total e progressiva se comparado ao mesmo diluidor com 3% de metilformamida + 2% de glicerol, o que mostra que o glicerol é um crioprotetor que pode ser utilizado em diferentes protocolos de congelamento.

- O resfriamento do sêmen por 120 minutos antes do congelamento em si pode ser realizado tanto em tubos quanto em palhetas de 0,5 mL, sem prejuízos às motilidades espermáticas total e progressiva após congelamento.

- O resfriamento do sêmen por 120 minutos é eficaz em manter as motilidades espermáticas total e progressiva após descongelamento.

## 7. Referências Bibliográficas

- ADEOYA-OSIGUWA, S.A.; FRASER, L.R. A biphasic pattern of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake by mouse spermatozoa in vitro correlates with changing functional potential. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p.187-194, 1993.
- AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. **Theriogenology**, v. 57, p. 1801-1808, 2002.
- AKHISA, T.; KOKKE, W. Naturally occurring sterols and related compounds from plants. In: **Patterson, G.W. and W.D. Nes (Eds.), Physiology and Biochemistry of Sterols**. American Oil Chemists Society, Champaign, IL, USA., p. 172-228, 1991.
- AKSOY, M.; AKMAN, O.; LEHIMCIOGLU, N. C.; ERDEM, H. Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 166-172, 2010.
- ALBRIZIO, M.; LACALANDRA, G.M.; MICERA, E.; MORAMARCO, A.M.; SURDO, N.C.; NICASSIO, M.; ZARRILLI, A. Effects of cryopreservation on capacitation, acrosome reaction and activity of L-type voltage-dependent calcium channels of equine sperm cells. **Animal Reproduction Science**. v. 121S, S218–S219, 2010.
- ALVARENGA, M.A. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: Workshop on Transporting Gametes and Embryos, 2003, Brewster, Mass. **Proceedings...** New York, NY: Havemeyer Foundation, p.74-76, 2003.
- ALVARENGA, M.A.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SQUIRES, E.L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14, 2000, Stockholm, **Proceedings**. Stockholm, p.157, 2000a.
- ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 6, p. 541-545, 2000b.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L.; Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**. v.89, p. 105–113, 2005.
- ÀLVAREZ, A. L.; SERRES, C.; TORRES, P.; CRESPO, F; MATEOS, E.; GÓMEZ-CUÉTARA, C. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 89-91, 2006.

- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: **McKINNON, A. O., OSS, J. L. (Eds.), Equine reproduction**. Malvern: Lea & Fabiger, p.715-45, 1993.
- AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 317-325, 2004.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p.145-73, 1987.
- AMORIM, E. A. M.; GRAHAM, J. K.; SPIZZIRI, B.; MEYERS, M.; TORRES, C. A. A. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v. 58, p. 210-214, 2009.
- AMORIM, E.A.M.; GRAHAM, J.D.; MEYERS, M.; SPIZZIRI, B. Delivering cholestanol or desmosterol to bull sperm membranes improves cryosurvival. 34th Annual Conference of the International Embryos Transfer Society (IETS), **Proceedings...** The journal Reproduction, Fertility & Development, January 5-9, Denver – CO – EUA, 2008.
- AMORIM, E.A.M.; GRAHAM, J.D.; SPIZZIRI, B.; MEYERS, M.; AMORIM, L.S.; TORRES, C.A.A. The effect of adding cholesteryl-heptanoate, - palmitate, - pelargonate, or -stearate loaded cyclodextrin on bull sperm cryosurvival. 40th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR), **Proceeding...** 40th Annual Meeting of the SSR, July, San Antonio – TX – EUA, 2007.
- ANCHORDOGUY, T.J.; RUDOLPH, A.S.; CARPENTER, J.F.; CROWE, J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipides during freezing. **Cryobiology**, v. 24, p. 324-331, 1987.
- ANTON, M.; CASTELLANI, O.; GUÉRIN-DUBIARD, C. Phosvitin. In: **Bioactive Egg Compounds**. Huopalahti, R. López-Fañdino, R. Anton, M., and Schade, R. (eds) Springer Press, Europe, pp. 17-24, 2007.
- ARRUDA, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121f. **Tese (Livre Docência)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.
- ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, supl., p. 226-227, 2003.



- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.
- ASHWOOD-SMITH, M.J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: **Bowler, K. and Fuller, B.J. Temperature and animal cells**. Cambridge: Biologists Ltda, p. 395-406, 1987.
- AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, p. 791–797, 1996.
- AUSTIN, C. R. The ‘Capacitation’ of the Mammalian sperm. **Nature**, v. 170, p. 326, 1952.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 1061–1069, 2001.
- BARKER, C.A.; GANDIER, S.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 21 (2), p. 47-51, 1957.
- BARRERA-COMPEAN, M. H.; PURDY, P. H.; DZAKUMA, J. M.; NEWTON, G. R.; NUTI, L. C. Cholesterol-loaded cyclodextrins improves post-thaw goat sperm motility. **Journal of Animal Science**, v. 83(Suppl.1), p. 153, 2005.
- BAUDOT, A.; CAULA, C.; DUARTE, M.L.; FAUSTO, R. Thermal study of simple aminoalcohol solution, **Cryobiology**, v. 44, p. 150-160, 2002.
- 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, p. 191-216, 1995.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BRIZ, R.C. Ovos com teores mais elevados de ácidos graxos ômega 3. In: **Simpósio Técnico De Produção De Ovos, 7, 1997, São Paulo. Anais...** São Paulo: APA, p.153-193, 1997.
- BUCHANAN, B.R.; SEIDEL, G.E.; MCCUE, P.M.; SCHENK, J.L.; HERICKHOFF, L.A.; SQUIRES, E.L. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. **Theriogenology**; v. 53, p. 1309-21, 2000.
- BURNS, P.J. Modification of kenney's extender for cryopreservation of equine spermatozoa. In: **INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12., 1992, Den Haag.** **Proceedings...** Den Haag, 1992. p. 1849-1851, 1992.

- BURNS, P.J.; REASNER, D.S. Computerized analysis of sperm motion: effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.15, p. 377-380, 1995.
- BWANGA, C.O.; HOFINO, P.O.; GREVLE, I.S. EINARSSON, S. & H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. In vivo fertilizing capacity of deep-frozen boar semen packaged in plastic bags and maxi-straws. **Journal of Veterinary Medicine**, A38, 281-286. In: 12th International Congress on Animal Reproduction, the Hague, 1992. Workshop on sperm preservation in swine. The Cleveland Museum of Natural History; 1991.
- CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; FERNANDES, C.; NASCIMENTO, J.; TICIANELLI, J.S.; ARRUDA, R.P. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.1285-1292, 2010a.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ALBUQUERQUE, R.; SILVA, F.H.A.; FARIA, D.E.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Utilization of fluorescent probe association for simultaneous assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes in fowl spermatozoa. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.9, p.143-149, 2007a.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.479-488, 2007b.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.119-131, 2008.
- CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P. Simultaneous assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes of ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.536-543, 2010b.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M. Changes in sperm quality e lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**. v. 121(3), p. 395-401, 2001.
- CHANG, M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. **Nature**, v. 168, p. 697-698, 1951.
- CHENG, H., LEDERER, W.J.; CANNELL, M.B. Calcium sparks - elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart-muscle. **Science**, v. 262(5134), p. 740-744, 1993.
- CLULOW, J.R.; BUSS, H.; SIEME, H.; RODGER, J.A.; CAWDELL-SMITH, A.J.; EVANS, G. *et al.* Field fertility of sex-sorted and non-sorted frozen-thawed stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.108, p. 287-97, 2008.

- CLULOW, J.R.; EVANS, G.; MORRIS, L.H.; MAXWELL, W.M. Factors influencing the “sortability” of stallion spermatozoa into X- and Y-chromosome bearing populations. **Animal Reproduction Science**; v. 113, p. 220-8, 2009.
- COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P.; PICKETT, B.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, p. 25-38, 1984.
- COMBES, G. B.; VARNER, D. D.; SCHROEDER, F.; BURGHARDT, R. C.; BLANCHARD, T. L. Effect of cholesterol on the motility e plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 56, p. 127–132, 2000.
- CRISTANELLI, M.J.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 24, p. 681–686, 1985.
- CROCKETT, E.L. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. **American Zoologist**. v. 38, p. 291–304, 1998.
- CROSS, N. L. Multiple effects of seminal plasma on the acrossome reaction of human sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, p. 316-323, 1993.
- CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 7-11, 1998.
- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; AURELLWISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemistry Journal**, v. 242, p.1-10, 1987.
- CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v. 5; p. 46-52, 2000.
- DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 48, p. 831-841, 1997.
- DE GRAAF, S. P.; EVANS, G.; GILLAN, L.; GUERRA, M.M.; MAXWELL, W.M.; O'BRIEN, J.K. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, p. 217-227, 2007.
- DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compound on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v. 30, p. 32-44, 1993.

- DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; ZAHN, F.S. Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p.324-325, 2001.
- DULBECCO, R. & VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. **Journal of Experimental Medicine**, v. 99, p. 167-182, 1954.
- ESCOFFIER, J.; KRAPF, D.; NAVARRETE, F.; DARSZON, A.; VISCONTI, P.E. Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. **Journal of Cell Science**, v. 125, p. 473-485, 2012.
- FARREL, P.B.; FOOTE, R.N.; MCARDLE, M.M.; TROUERN-TREND, V.L.; TARDIF, A.L. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Andrology**, v.17, p.293-300, 1996.
- FARSTARD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 251-260, 1996.
- FERREIRA, J.C.P.; NEVES NETO JR.; PAPA, F.O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, p.131-32, 1997.
- FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.
- GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.; STOUT, T.A.; COLENBREER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68(3-4), p. 249-265, 2001.
- GALLI, C.; LAZZARI, G. The manipulation of gametes and embryos in farm animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43(Suppl 2), p.1-7. 2008.
- GAO, D.Y.; MAZUR, P.; CRITSER, J.K. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: **Karow, A.M., Critser, J.K. (Eds.), Reproductive Tissue Banking**. Academic Press, New York, p. 263–328, 1997.
- GARCÍA , B.M.; FERRUSOLA, C.O.; APARICIO, I.M.; MIRÓ-MORÁN, A.; RODRIGUEZ, A.M.; BOLAÑOS, J.M.G.; FERNÁNDEZ, L.G.; BALAO DA SILVA, C.M.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. **Theriogenology**, v. 77, p. 1280–1289, 2012.

- GARDES, T.P.; CARDOSO, R.N.R.; ARRUDA, R.P.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; GALLEGOS, A.M.; ANDRADE, A.F.C. Comparação da eficiência de meios para a capacitação dos espermatozoides através das análises por citometria de fluxo e computadorizada da motilidade. **Anais...** In: Simpósio de Pesquisa e Pós-Graduação do Departamento de Reprodução Animal, 3, 2010, Pirassununga-SP. Pirassununga, SP: USP/FMVZ, 2010.
- GIBB, Z.; GRUPEN, C.G.; MAXWELL, W.M.; MORRIS, L.H. Improvements in the fertility of cryopreserved, sex-sorted stallion sperm after low-dose hysteroscopic insemination (**Abstract**). In: International Symposium on Equine Embryo Transfer; July 29, Vancouver, BC, Canada, 2012.
- GIBB, Z.; MORRIS, L.H.A.; MAXWELL, W.M.C.; GRUPEN, C.G. Dimethyl formamide improves the postthaw characteristics of sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, v. 79, p.1027–1033, 2013.
- GILMORE, J.A.; LIU, J.; PETER, A.T.; CRITSER, J.K. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 28–36, 1998.
- GILMORE, J.A.; MCGANN, L.E.; LIU, J.; GAO, D.Y.; PETER, A.T.; KLEINHANS, F.W.; CRITSER, J.K. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 985–995, 1995.
- GLAZAR, A.I.; MULLEN, S.F.; LIU, J.; BENSON, J.D.; CRITSER, J.K.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Cryobiology**, v. 59, p. 201-206, 2009.
- GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion spermatozoa for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v. 58, p. 277-279, 2002a.
- GOMES, G.M.; PAPA, F.O.; JACOB, J.C.F.; MACEDO, L.P.; LEÃO, K.M.; MACHADO, M.S.; ALVARENGA, M.A. Melhoria dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento com o meio MP 50 para sêmen de garanhões da raça mangalarga machador. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.187-189, 2002b.
- GRADY, S.T.; CAVINDER, C.A.; BRINSKO, S.P.; FORREST, D.W.; SAWYER, J.E.; SCOTT, B.D. Dietary supplementation of two varying sources of n-3 fatty acids and subsequent effects on fresh, cooled, and frozen seminal characteristics of stallions. **The Professional Animal Scientist**, v. 25. p. 768–773, 2009.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147, 1996.
- GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H.; HOUGH, S.R. Penetration of zona-free hamster eggs by liposome treated sperm from bull, ram, stallion and boar. **Biology of Reproduction**, v. 37, p.181-188, 1987.

- GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H.; PARRISH, J.J. Effect of dilauroylphosphatidylcholine on the acrosome reaction and subsequent penetration of bull spermatozoa into zona-free hamster eggs. **Biology of Reproduction**, v. 35, p.413-424, 1986.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.
- HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm; what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73-88, 1990.
- HEISE, A.; AHN, W.K.; VOLKMANN, D.H.; THOMPSON, P.N.; GERBER, D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 48–53, 2010.
- HOFFMANN, N.; MORANDINI, C.; SIEME, H. Determination of the optimal concentration of cryoprotectant agent for freezing stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 121S, p.S160–S162, 2010.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 1/3, p. 3-22, 2000.
- HOOGEWIJS, M.; RIJSSELAERE, T.; VliegHER, S.; VANHAESEBROUCK, E.; SCHAUWER, C.; GOVAERE, J. *et al.* Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. **Theriogenology**, v. 74, p.118-26, 2010.
- HUNTER, R. H. F. Capacitation of mammalian spermatozoa: a physiological perspective set against presumptive maturation in vitro. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, n. 6, p. 21-23, 2001.
- IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. Evaluation of the Hamilton-Thorn computer-based automated system for dog semen analysis. **Theriogenology**, v.55, p.733-749, 2001.
- JAMES, A.N.; GREEN, H.; HOFFMAN, S.; LANDRY, A.M.; PACCAMONTI, D.; GODKE, R.A. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 h. **Theriogenology** v. 58, p.401–404, 2002.
- JASKO, D.J. Evaluation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 8, p. 129-48, 1992.
- JASKO, D.J.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v. 35,n.6, p.1059-1067, 1991.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62 n.1-3, p.143-172, 2000.

- JULIANI, G.C.; HENRY, M. Efeito do glicerol, etilenoglicol, acetamida e leite desnatado na criopreservação de espermatozóides equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1103-1109, 2008.
- KANDELOUSI, M.A.S.; ARSHAMI, J.; NASERIAN, A.A.; ABAVISANI, A. The effects of addition of omega-3, 6, 9 fatty acids on the quality of bovine chilled and frozen-thawed sperm. **Open Veterinary Journal**, v. 3(1), p.47-52, 2013.
- KATILA, T.; ANDERSON, M.; REILAS, T.; KOSKINEN, E. Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. **Theriogenology**, v.58, p. 241–244, 2002.
- KEITH, S.L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Fort Collins, Colorado, USA: Colorado State University, 1998. 104p. **Thesis** (Master of Science), CSU, 1998.
- KENNEY, R. M.; BERGMAN, R. V.; COOPER, W.L. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: American Association equine Practitioners, 1975, **Proceedings...** v.21, p.327-336, 1975.
- KHORASANI, A.M.; CHEUNG, A.P.; LEE, C.Y.G. Cholesterol inhibitory effects on human sperm-induced acrosome reaction. **Journal of Andrology**, v.21, p. 586-594, 2000.
- KOMAREK, R.J, PICKERR, B.W., GIBSON, E.W., LANZ, R.N. Composition of lipids in stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 10, p. 337 – 342, 1965.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C; GRAHAM, J.K.; ALVARENGA, M.A.; SQUIRES, E.L. Calcium influx into equine and bovine spermatozoa during in vitro capacitation. **Animal Reproduction**, v.1, n.1., p.96-105, 2004.
- LARDY, H.A.; PHILLIPS, P.H. Preservation of spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.1, p.219 - 221. 1939.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113–141, 2000.
- LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acid considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v. 2, p. 246–256, 1996.
- LINDSEY, A.C.; SCHENK, J.L.; GRAHAM, J.K.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**; v. 34, p. 121–7, 2002b.

- LINDSEY, A.C.; VARNER, D.D.; SEIDEL JR, G.E.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Hysteroscopic or rectally guided, deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18 h at either 5 degrees C or 15 degrees C prior to flow-cytometric sorting. **Animal Reproduction Science**; v. 85, p. 125-30. 2005.
- LINDSEY, A.C.; MORRIS, L.H.A.; ALLEN, W.R.; SCHENK, J.L.; SQUIRES, E.L.; BRUEMMER, J.E. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, p. 128-32, 2002a.
- LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 119-128, 2008.
- MACPHERSON, M.L.; SHORE, M.D.; FERNANDEZ, M.H.; MILLER, C.D.; THOMPSON, J.A.; BLANCHARD, T.L. *et al.* Processing factors which influence viability and fertility of cryopreserved equine spermatozoa. **Havemeyer Foundation Mono Series**; v.6, p. 27-9, 2001.
- MAKLER, A.; FISHER, M.; MURILLO, O.; LAUIER, N.; DECHERNEY, A.; NAFTOLIN, F. Factors affecting sperm motility, IX: survival of spermatozoa in various biological media under different gaseous compositions. **Fertility and Sterility**, v. 41, p. 428-432, 1984.
- MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.; CEROLINI, S.; PENNY, P.; NOBLE, R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 411-421, 2005.
- MANN, T. **The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract**. Methuen, London, 493 p. 1964.
- MARTI, E.; MARTI, J.I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 29(4), p. 459-467, 2008.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement**, v. 27:p.47-51, 1979.
- MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.225-232, 2008.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v. 247, n.16, p.125-142, 1984.
- MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, v. 14, n. 3, p. 251-272, 1977.



- MCDOWELL, L. R. **Vitamins in animal nutrition (Ed. L. R. McDowell)**. Academic Press, New York, USA. p. 298-322 e 365-387, 1989.
- McPARTLIN, L.A.; LITTELL, J., MARK, E.; NELSON, J.L.; TRAVIS, A.J.; BEDFORD-GUAUS, S.J. A defined medium supports changes consistent with capacitation in stallion sperm, as evidenced by increases in protein tyrosine phosphorylation and high rates of acrosomal exocytosis. **Theriogenology**, v. 69, Issue 5, p. 639–650, 2008.
- MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.
- MESEGUER, M.; GARRIDO, N.; MARTINEZ-CONEJERO, J.A.; SIMON, C.; PELLICER, A.; REMOHI, J. Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 3, p. 588-594, 2004.
- MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J. K. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45 (Suppl. 2), p. 57–66, 2010a.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 826–833, 2006.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. Effect of egg yolk, cooling / thawing rates and cholesterol on cryosurvival of rabbit sperm. In: The American Society of Andrology (ed.), 30th Annual Meeting of the American Society of Andrology, Seattle, WA, USA. **Journal of Andrology Supplement** March–April, 79, abstract 121, 2005.
- MOCÉ, E.; PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Treating ram sperm with cholesterol loaded cyclodextrins improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 236-247, 2010b.
- MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; BRUEMMER, J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, Issue 5, p. 215–218, 2006.
- MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v.51, p.241-249, 2005a.
- MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology** 63, 2372–2381. 2005b.
- MORAES, E. A.; GRAHAM, J. K.; TORRES, C. A. A.; MEYERS, M.; SPIZZIRI, B. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 148-154, 2010.

- MORAES, E.A.; MATOS, W.C.G.; GRAHAM, J.K.; FERRARI Jr., W.D. Cholesterol-loaded-cyclodextrin improves the quality of stallion spermatozoa after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.04.004, 2015.
- MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.999-1012, 1992.
- MORILLO RODRÍGUEZ, A.; ORTEGA FERRUSOLA, C; MACÍAS GARCÍA, B.; MORRELL, J.M.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Freezing stallion semen with the new Cáceres extender improves post thaw sperm quality and diminishes stallion-to-stallion variability. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p.78– 83, 2011.
- MORRIS, L.H.; ALLEN, W.R. An overview of low dose insemination in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**; v. 37, p. 206-10, 2002.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by a easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-1706, 2002.
- MOVASSAGHI, S.; SAKI, G.; JAVADNIA, F.; PANAH, M.; MAHMOUDI, M.; RHIM, F. Effects of methyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on cryosurvival of spermatozoa from C57BL/6 Mouse. **Journal of Biological Sciences**, v. 12, p. 19-25, 2009.
- MÜLLER, K.; MÜLLER, P.; PINCEMY, G.; KURZ, A.; LABBE, C. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 390– 399, 2008.
- MURADÁS, P.R.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; GRANEMANN, L.C.; SANTOS, I.W.; PIMPÃO, C.T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, p. 69–74, 2006.
- NA, HYE-SOOK.; KIM, JI-NA.; KIM, JIN-MAN.; LEE, KI-YOUNG. Encapsulation of fish oil using cyclodextrin and whey protein concentrate. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 1077-1082, 2011.
- NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ALONSO, M.A.; CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, p.351-358, 2008.

- NAVRATIL, A.M.; BLISS, S.P; BERGHORN, K.A.; HAUGHIAN, J.M.; FARMERIE, T.A.; GRAHAM, J.K.; CLAY, C.M.; ROBERSON, M.S. Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p.31593-31602, 2003.
- NETTLETON, J.A. Omega-3 fatty acids: Comparison of plant and seafood sources in human nutrition. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 91, p. 331-337, 1991.
- NEVES NETO, J.R.; PAPA, F.O.; LEME, D.P. Avaliação entre congelabilidade e fertilidade do sêmen equino frente a dois diluidores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.301-302, 1999.
- NEWCOMBE, J.R.; PACCAMONTI, D.; CUERVO-ARANGO, J. Reducing the examination interval to detect ovulation below 12 h does not improve pregnancy rates after postovulatory insemination with frozen/thawed semen in mares. **Animal Reproduction Science**, 123, 60-63, 2011.
- NOLAN, J.P.; GRAHAM, J.K.; HAMMERSTEDT, R.H. Artificial induction of exocytosis in bull sperm. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 292, p.311-322, 1992.
- OLIVEIRA, C. H.; VASCONCELOS, A. B.; SOUZA, F. A.; MARTINS-FILHO, O. A.; SILVA, M. X.; VARAGO, F. C.; LAGARES, M. A. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 194–200, 2010.
- OLIVEIRA, E.C.S. Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino. 2003, 61p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2003.
- OLIVEIRA, R.R.; RATES, D.M.; PUGLIESI, G.; KER, P.G.; ARRUDA, R.P.; MORAES, E.A.; CARVALHO, G.R. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin in donkey semen cryopreservation improves sperm viability but results in low fertility in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 845–850, 2014.
- PACE, M.M.; SULLIVAN, J.J. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement 23; p. 115-121, 1975.
- PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10., 1984. **Proceedings...** Urbana, 1984. p.377, 1984.
- PAPA, F.O.; FELÍCIO, G.B.; MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; DE VITA, B.; AVANZI, B.R.; DELL'AQUA JR, J.A. Effect of substituting soybean lecithin for egg yolk in an extender used for the cryopreservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 121S. p. S171–S172, 2010.

- PAPA, F.O.; TAVARES, C.V.N.; MEIRA, C. *et al.* Glicina-gema: proposta de um novo diluidor para a congelação de sêmen bovino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10., 1993, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1993. p.313, 1993.
- PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'ÁQUA JÚNIOR, J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP 50 para a criopreservação de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.184-187, 2002.
- PARK, P.W.; GOINS, R.E. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 1262-1266, 1994.
- PARKS, E.J.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membrans. **Theriogenology**, v. 38, 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, p. 255–266, 1992.
- PASQUINI, D.F.; MELO, C.M.; PAPA, F.O.; FIORATTI, E.G.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; ALVARENGA, M.A.; ZAHN, F.S.; DE VITA, B.; DELL'ÁQUA JR., J.A. Effects of seminal plasma and sperm motility factors on viability of epididymal sperm of stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 338–339, 2008.
- PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, Issue 6, p. 859–875, 2000.
- PEÑA, A.L.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Flow cytometric assessment of acrosomal status and viability of dog spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, p. 495-502, 1999.
- PÉREZ-PÉ, R.; CÉBRIAN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.56, p.425-434, 2001.
- PHILLIPS PH. The preservation of bull semen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 130, p.415, 1939.
- PHILLIPS, K.M.; RUGGIO, D.M.; HOWE, J.C.; LEHESKA, J.M.; SMITH, S.B.; ENGLE, T.; CONLEY, N.A. Preparation and characterization of control materials for analysis of conjugated linoleic acid and trans-vaccenic acid in beef. **Food Research International**, v. 43, p. 2253-2261, 2010.
- PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: **McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, Cap. 83, p. 769-789, 1992.

- PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P.; MCKINNON, A.O. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, **Bulletin #03**, 125 p., 1987.
- PILLET, E.; DUCHAMP, G.; BATELLIER, F.; BEAUMAL, V.; ANTON, M.; DESHERCES, S.; SCHMITT, E.; MAGISTRINI, M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. **Theriogenology**, v. 75, p.105–114, 2011.
- POMMER, A.C.; MEYERS, S. A. Tyrosine phosphorylation is an indicator of capacitation status in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, p. 351- 354, 2002.
- POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, J.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 46B, p. 541–549, 1973.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- 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, p.522-527, 2004b.
- PURDY, P.H.; FOX, M.H.; GRAHAM, J.K. The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. **Cryobiology**, v. 51 (1), p. 102–112, 2005.
- PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v.48, p.36-45, 2004b.
- PURDY, P.H.; MOCÉ, E.; STOBART, R.; MURDOCH, W.J.; MOSS, G.E.; LARSON, B.; RAMSEY, S.; GRAHAM, J.K.; BLACKBURN, H.D. The fertility of ram sperm held for 24h at 5 degrees C prior to cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 118(2-4), p. 231-235, 2010.
- QUINN, P. J.; WHITE, I. G. Phospholipid and cholesterol content of epididymal and ejaculated ram spermatozoa and seminal plasma in relation to cold shock. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 20, p. 1205-1215, 1967.
- RATES, D.M. Efeito da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozoides sobre o congelamento e fertilidade do sêmen de jumentos (*equus asinus*) da raça pega. 2011, 81p. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa - Viçosa/MG, 2011.
- RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 462-470, 2001.

- REGIERT, M.; WIMMER, T.; MOLDENHAUER, J. P. Application of  $\gamma$ -cyclodextrin for the stabilization and/or dispersion of vegetable oils containing triglycerides of polyunsaturated acids. **Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry**, v. 25(1-3), p. 213-216, 1996.
- ROCHA, A.S.; ULIANI, R.C.; MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Influência da curva de congelação e do volume das palhetas na recongelação de sêmen equino. **Anais...** In: XI Conferência Annual da ABRAVEQ; 12-13 de Junho, São Paulo, 2010.
- ROTTEM, S.; YASHOUV, J.; NE'EMAN, A.; RAZIN, A. Composition, ultrastructure and biological properties of membrane from *Mycoplasma mycoides* var. *capri* cells adapted to grow with low cholesterol concentrations. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 323, p. 495-508, 1973.
- SAMPER, J.C.; HELLANDER, J.C.; CRABO, B.G.. Relationship between the fertility of fresh and frozen semen and semen quality. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.44, suppl., p.107-114, 1991.
- SAS Institute Inc., **SAS user's guide: Statistics, version 9.3. 2002-2010**, ed. Cary, NC: SAS Institute Inc.; 2002-2010.
- SCOTT, T.W. Lipid metabolism of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 18. p. 65-76, 1973.
- SEIDEL, G.E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: THECNQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS, 1996, Fort Collins. **Proceedings**. Fort Collins: Colorado State University, p. 6-16, 1996.
- SINGH, J. P.; BABCOCK, D. F.; LARDY, H. A. Increased Ca ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 172, p. 549-556, 1978.
- SPIZZIRI, B. E.; FOX, M. H.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Cholestesrol-loaded-cyclodextrins and fertility pontential of stallions spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 255-264, 2010a.
- SPIZZIRI, B. E.; KAULA, N., SQUIRES E.L.; GRAHAM, J. K. *In vitro* capacitation of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p.181–183. 2010b.
- SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Colorado State University 80 p. (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, **Bulletim**, N. 9), 1999.
- STEWART, J.C.M. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. **Analytical Biochemistry**, v. 104, p. 10-14, 1980.

- STOREY, B.T.; NOILES, E.E.; THOMPSON, K.A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide defined cryoprotectant medium for mouse spermatozoa cryopreservation. **Cryobiology**, v. 37, p. 46-58, 1998.
- SUKARDI, S.; CURRY, M. R.; WATSON, P. F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science**, v. 46, p. 89–96, 1997.
- SWAIN, S.E.; MILLER, R.R.JR. A postcryogenic comparison of membrane fatty acids of elephant spermatozoa. **Zoo Biology**, v. 19, p. 461–473, 2000.
- SZENTE, L.; SZEJTLI, J.; SZEMÁN, J.; KATÓ, L. Fatty acid-cyclodextrin complexes: properties and applications. **Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry**, v. 16(4), p. 339-354, 1993.
- TAKAHASHI, T.; ITOH, R.; NISHINOMIYA, H.; KATOH, M.; MANABE, N. Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.92-97, 2012.
- TALBOT, P.; SUMMERS, R.G.; HYLANDER, B.L.; KEOUGH, E.M.; FRANKLIN, L.E. The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A23187. **Journal of Experimental Zoology**, v. 198, p. 383-392, 1976.
- TARDIF, A.L.; FARREL, P.B.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R.H. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5 °C. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1606-1612, 1997.
- TAVILANI, H.; DOOSTI, M.; NOURMOHAMMADI, I.; MAHJUB, H.; VAISIRAYGANI, A.; SALIMI, S.; HOSSEINIPANAH, S.M. Lipid composition of spermatozoa in normozoospermic asthenozoospermic males. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**; v. 77, p. 45– 50, 2007.
- THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, p. 1531–1550, 2006.
- TISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.27, suppl., p.53-59, 1979.
- TOMÁS, C.; BLANCH, E.; MOCÉ, E. Evaluación de la motilidad durante el proceso de crioconservación tras la adición o eliminación de colesterol de las membranas plasmáticas de espermatozoides de verraco. In: **Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario-AIDA (ed.), XIII Jornadas sobre Producción Animal**, Zaragoza, Spain. AIDA, Tomo II, pp. 732–734, 2009a.

- TOMÁS, C.; GIL, M. A.; MOCÉ, E.; HERNÁNDEZ, M.; MARTÍNEZ, E. A.; VÁZQUEZ, J. M.; ROCA, J. Exposure fresh sperm to cholesterol-loaded cyclodextrins improves *in vitro* fertilizing ability of frozen-thawed boar sperm. In: de Kruif, A.; Van Soom, A. (eds), 13th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), Ghent, Belgium. **Reproduction in Domestic Animals**, 44 (Suppl. 3), 128 (Abstract P172), 2009b.
- TORRES, C. A. A.; MORAES, E. A.; GRAHAM, J. K.; ROMUALDO, P. L. The effect of adding cholesterol-loaded cyclodextrin on boar sperm cryosurvival. in: Fazleabas AT, Hunt PA, Plant TM, 42nd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR) "Science for the Public Good", Pittsburgh, PA, USA. **Biololy of Reproduction** Special Issue 81, p. 455, 2009.
- TRIANA, L.R.; BABCOCK, D.F.; LORTON, S.P.; FIRST, N.L.; LARDY, H.Á. Release of acrosomal hyaluronidase follows increase membrane permeability to calcium in the presumptive capacitation sequence for spermatozoa of the bovine and other mammalian species. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 47-59, 1980.
- ULIANI, R.C.; MONTEIRO, G.A.; ROCHA, A.S.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Avaliação das características do sêmen equino após recongelações com diferentes diluentes. **Anais...** In: XI Conferência Annual da ABRAVEQ; 12-13 de Junho, São Paulo, 2010.
- URNER, F.; SAKKAS, D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 125, p. 17-26, 2003.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.
- VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p.115-136, 2005.
- VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improves post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 907-919, 2000.
- VIDAMENT, M.; VICENT, P.; MARTIN, F.X.; MAGISTRINI, M.; BLEBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 22-35, 2009.
- VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1-6, 1998.



- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7(4) p. 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.
- WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: **MORRIS, G. J.; CLARKE, A. (Eds.)**. Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. Academic Press, London, p. 189-218, 1981.
- WHITE, D.R.; AITKEN, R.J. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. **Gamete Research**, v. 22, p. 163-177, 1989.
- WHITE, I. G. Lipids and calcium uptakes of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, n. 6, p. 639–658, 1993.
- WHITTEN, W.K.; BIGGERS, J.D. Complete development *in vitro* of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, p. 399–401, 1968.
- WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, p. 438-450, 2001.
- YANAGIMACHI, R.; USUI, N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 89, p. 161-174, 1974.
- YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, p. 579-585, 2000.
- YING, C.; MING-LI, H.; YAN-HUA, Z.; HUA-JIE, W. Improvement of oxidative stability of conjugated linolenic acid by complexation with beta-cyclodextrin. **Micro & Nano Letters**, IET, v. 6(10), p. 874-877, 2011.
- 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, p. 237–240, 2002.
- ZENG, W. X.; TERADA, T. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 111–118, 2001.
- ZENG, W. X.; TERADA, T. Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Reproduction Fertility and Development**, v. 12, p. 223–228, 2000.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HÅÅRD, M.G.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an IA-programe. **International Journal of Andrology**, v.22, p.253-260, 1999.

## 8. Anexos

### 8.1. MW (Modified Whitten's Medium)

MW	Código Sigma	mM	Quantidade em 1L
NaCl	S9625	100	5,84 g
KCl	P3911	4,78	0,357 g
CaCl <sub>2</sub>	4225	2,5	0,275 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	P0662	1,19	0,207 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	M2393	1,19	0,293
NaHCO <sub>3</sub>	S6014	25,07	2,106 g
Piruvato de Sódio	P2256	1	0,022 g
Lactato de Sódio	L1375	4,8	3,68 mL
Glicose	G8270	5,5	0,991 g
HEPES	H3375	22	5,236 g
BSA	A9647	-	7 g
Água Destilada	-	-	Completar para 1000 mL

(Modificado de Whitten and Biggers, 1968; por McPartlin *et al.*, 2008)

### 8.2. FR5 Modificado

<b>Solução 1: FR1</b>				
Água Destilada	100 mL	250 mL	500 mL	1000 mL
Glicose	5 g	12,5 g	25 g	50 g
Lactose	0,3 g	0,75 g	1,5 g	3 g
Rafinose	0,3 g	0,75 g	1,5 g	3 g
Citrato de Sódio	0,05 g	0,125 g	0,25 g	0,5 g
Citrato de Potássio	0,082 g	0,205 g	0,41 g	0,82 g
HEPES	1,42 g	3,55 g	7,1 g	14,2 g
300 – 310 mOsm / pH 7,2 – 7,4				
Cada 100 mL dessa solução faz 250 mL do FR5				
<b>Solução 2: Leite em pó - Glicose</b>				
Água Destilada	100 mL	250 mL	500 mL	1000 mL
Leite em pó desnatado	14,4 g	36 g	72 g	144 g
Glicose	0,8 g	2 g	4 g	8 g
300 – 310 mOsm / pH 7,2 – 7,4				
<b>Solução 3: FR4</b>				
Adicionar volumes iguais da solução 1 e solução 2				
Adicionar 3% de gema de ovo ao volume final				
Centrifugar a 7000 g por 30 minutos				
Filtrar o sobrenadante em filtros de papel 8 microns a vácuo				
<b>Solução 4: FR5</b>				
Adicionar Crioprotetor (5% glicerol)				

### 8.3. Lactose-EDTA

<b>Solução 1: Glicose – EDTA</b>	
Glicose (D8270, 1KG / Sigma)	15 g
Citrato de Sódio Diidratado (S4641, 500 g / Sigma)	0,0925 g
EDTA disódio diidratado (E6635, 100 g / Sigma)	0,0925
Bicarbonato de Sódio (S5761, 500 g / Sigma)	0,03
Volume final em água destilada	250 mL
pH = 6,89 / 290 mOsmol	
<b>Solução 2: Lactose 11%</b>	
Lactose monoidratada (61340, 1 Kg / Fluka BioChemika)	33 g
Volume final em água destilada	300 mL
<b>Solução 3: Lactose-EDTA</b>	
Solução 1	125 mL
Solução 2	275 mL
Gema de ovo	100 mL
Sódio dodecil sulfato - SDS (L4390, 25 g / Sigma)	0,2 g
HEPES (H3375, 250 g / Sigma)	1,19 g
Centrifugação: 10000 g / 30 min	
Filtragem a vácuo em filtro de papel 25 µm	
Adição do Crioprotetor (Martin <i>et al.</i> , 1979)	

### 8.4. Sacarose-EDTA

<b>Solução 1: Glicose - EDTA</b>	
Glicose (D8270, 1KG / Sigma)	15 g
Citrato de Sódio Diidratado (S4641, 500 g / Sigma)	0,0925 g
EDTA disódio (E6635, 100 g / Sigma)	0,0925
Bicarbonato de Sódio (S5761, 500 g / Sigma)	0,03
Volume final em água destilada	250 mL
pH = 6,89 290 mOsmol	
<b>Solução 2: Sacarose</b>	
Sacarose (S9378, 500 g / Sigma)	31,35 g
Volume final em água destilada	300 mL
<b>Solução 3: Sacarose-EDTA</b>	
Solução 1	125 mL
Solução 2	275 mL
Gema de ovo	100 mL
SDS (L4390, 25 g / Sigma)	0,2 g
HEPES (H3375, 250 g / Sigma)	1,19 g
Centrifugação: 10000 g / 30 min	
Filtragem em filtro de papel 25 µm	
Adição de Crioprotetor (Glicerol 5%)	

### 8.5. PBS

NaCl	5 g
KCl	0,12 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,71 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,136 g
Água Destilada	Completar para 500 mL
pH 7,4	

(Dulbecco & Vogt, 1954)

### 8.6. Composição dos óleos utilizados

- Óleo de semente de linho (Natural Cold Pressed Flaxseed oil - 1200 mg, Nature's Bounty, Inc. Bohemia, NY – USA)

Ácido $\alpha$ -Linolênico (18:3, $\omega$ -3)	45%
Ácido Linoleico (18:2, $\omega$ -6)	11%
Ácido Oleico (18:1, $\omega$ -9)	11%
Outros ácidos graxos	5%

- Óleo de açafrão-bastardo (High Heat Safflower Oil, Celestial Group, Inc., Melville, NY – USA)

Ácidos graxos saturados	7%
Ácidos graxos poliinsaturados	14%
Ácidos graxos monoinsaturados	79%

- Óleo de salmão (Cold Water Salmon Oil - 1000 mg, Nature's Bounty, Inc. Bohemia, NY – USA)

Ácidos graxos $\omega$ -3 (20%)	11%: Ácido Docosahexaenóico (DHA, 22:6, $\omega$ -3)
	9%: Ácido Eicosapentaenóico (EPA, 20:5, $\omega$ -3)

- Óleo de fígado de bacalhau (Norwegian Cod Liver Oil, J. R. Carlson Laboratories, Inc., Arlington Hts., IL – USA)

Ácidos graxos $\omega$ -3	45%: Ácido Docosahexaenóico (DHA, 22:6, $\omega$ -3)
	36%: Ácido Eicosapentaenóico (EPA, 20:5, $\omega$ -3)