



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CAROLINA CERQUEIRA SARMENTO OLIVARES

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS PARA SELEÇÃO E INDUÇÃO DA
CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA EM CAPRINOS

NITERÓI
2013

CAROLINA CERQUEIRA SARMENTO OLIVARES

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS PARA SELEÇÃO E INDUÇÃO DA
CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA EM CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão
Coorientadores: Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca
Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

NITERÓI
2013

CAROLINA CERQUEIRA SARMENTO OLIVARES

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS PARA SELEÇÃO E INDUÇÃO DA
CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA EM CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão - orientador
Faculdade de Veterinária – UFF

Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca - coorientador
Embrapa Caprinos e Ovinos – Núcleo Regional Sudeste

Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo - coorientador
Embrapa Gado de Leite

Profa. Dra. Maria Clara Caldas Bussiere
Univeridade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Prof. Dr. Carlos Otávio De Paula Vasconcelos
Faculdade de Veterinária – UFF

NITERÓI
2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sobre todas as coisas, por ter sido o grande responsável por iluminar a minha mente e caminho, dando forças para iniciar essa trajetória, esperança para adquirir mais uma vitória e fibra para chegar até o fim;

Aos meus pais, que por intermédio de Deus, foram e são verdadeiros anjos, os quais sempre ofereceram o apoio necessário na minha vida, me estimulando a melhorar em todos os sentidos e me levantando mais forte cada vez que fraquejei;

Ao meu irmão e minha tia-mãe Cristina que sempre estiveram ao meu lado se prontificando a me ajudar em tudo que estivesse ao seu alcance;

Ao meu namorado e amigo, que Deus colocou estrategicamente na minha vida no início dessa jornada e que só acrescentou, a quem eu devo muito por todo suporte emocional e psicológico que me estimularam a seguir em frente;

Toda minha família, que mesmo em vários lugares diferentes e não tão próximos de mim o tempo todo, sempre deram força e cujo orgulho pela minha determinação me acionavam a seguir em frente mais firme;

A meus tios Edson e Denise e minhas primas Thaís e Lara que ofereceram a sua casa, comida, roupa lavada, amor e conforto sempre que precisei, em todos os dias difíceis de experimento ao longo desses dois anos;

A todos os meus colegas de profissão, amigos distantes e próximos que direta ou indiretamente tiveram participação nessa jornada, trazendo alegria nos momentos tensos, estendendo a mão nos momentos difíceis, e principalmente entendendo quando em alguns momentos eu precisei estar ausente;

Aos amigos do mestrado que estiveram sempre comigo, pelo companheirismo e incentivo nos momentos de dificuldade, em especial à Júlia Timponi, amiga que fiz nessa jornada e sei que vou poder contar para o resto da vida;

Ao meu professor e orientador Felipe Zandonadi Brandão, que me adotou e ofereceu essa oportunidade que tanto almejei, e a quem hoje, eu devo grande parte da minha formação profissional e postura ética e devo agradecer pela prontidão e pelas palavras sábias que, sempre de alguma forma, tranquilizavam e verteram a alcançar esse objetivo final;

A todos os professores da UFF do Setor de Reprodução e de outros Departamentos, aos funcionários e estagiários, alunos de mestrado e doutorado,

que cederam conhecimentos, ajuda, materiais, laboratório e que estiveram sempre dispostos a acrescentar em algo;

A minha Universidade que ofereceu as instalações, equipamentos e oportunidade para concluir essa trajetória;

A Embrapa, a todos os estagiários dessa instituição que tive o prazer de conhecer e ao meu coorientador Luiz Sérgio Camargo, pelo acolhimento, carinho, paciência, atenção e conhecimento oferecidos ao longo desses dois anos;

Ao Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca pela aprovação deste projeto junto a Embrapa, permitindo assim a execução do mesmo;

E a Capes pela oportunidade de desenvolver este projeto e pelo financiamento da bolsa de estudo.

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais, a quem eu devo a minha existência, meu caráter e determinação, minha educação, minha formação e mais uma vitória. Aos quais eu devo todo o meu amor.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da utilização de três métodos de seleção espermática e do nitroprussiato de sódio (NPS) na indução à capacitação de espermatozoides criopreservados de caprinos. No ensaio de seleção espermática, foram utilizados espermatozoides criopreservados de nove bodes da raça Saanen. Foram testados os seguintes métodos de seleção espermática: "Swim-up", gradiente de densidade Percoll e lavagem por centrifugação. Os parâmetros avaliados foram: motilidade, vigor, integridade de membranas plasmática e acrossomal antes e após os tratamentos e taxa de recuperação espermática. Na indução à capacitação foram utilizados espermatozoides criopreservados de sete machos da raça Saanen que foram submetidos à indução com as concentrações de 10, 50 e 100 μM de NPS e de heparina. Os mesmos parâmetros citados para o ensaio de seleção foram avaliados, exceto a taxa de recuperação espermática. A integridade de membranas plasmática e acrossomal foram avaliadas por meio da coloração dupla de azul tripan/Giemsa. Os resultados foram analisados por análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Student Newman Keuls. O método de Percoll recuperou mais ($P < 0,05$) espermatozoides ($28,1 \pm 3,3\%$) e com maior motilidade ($55,5 \pm 2,6\%$) do que o "Swim-up" ($2,27 \pm 0,3\%$ e $41,1 \pm 5,0\%$, respectivamente), já a taxa de recuperação espermática foi inferior ($P < 0,05$) à obtida na lavagem por centrifugação ($43,3 \pm 3,8\%$). Não houve diferença ($P > 0,05$) na proporção de espermatozoides com membrana plasmática (MP) intacta entre os tratamentos ($51,3 \pm 4,0\%$; $47,5 \pm 2,3\%$ e $47,1 \pm 3,3\%$ para "Swim-up", Percoll e lavagem, respectivamente), porém a proporção de espermatozoides com MP intacta e acrossoma lesado foi maior ($P < 0,05$) para o método de "Swim-up" do que para o Percoll e a lavagem ($4,0 \pm 0,8\%$; $1,8 \pm 0,3\%$ e $2,5 \pm 0,4\%$, respectivamente). Foi observada maior ($P < 0,05$) motilidade no momento após descongelamento ($57,6 \pm 2,4\%$) em relação aos grupos submetidos à indução da capacitação pelo NPS ($34,3 \pm 3,1\%$, $36,2 \pm 3,1\%$ e $38,3 \pm 3,5\%$, para as concentrações de 10, 50 e 100 μM , respectivamente). A motilidade diferiu ($P < 0,05$) entre o grupo exposto à 100 μM de NPS ($38,3 \pm 3,5\%$) e o grupo exposto à heparina ($28,1 \pm 3,6\%$). Quanto ao vigor, foi observada diferença ($P < 0,05$) entre os grupos tratados com NPS ($4,5 \pm 0,1$, $4,5 \pm 0,1$ e $4,7 \pm 0,1$, para 10, 50 e 100 μM , respectivamente) e o momento pós descongelamento ($3,3 \pm 0,1$). Foi encontrado maior vigor ($P < 0,05$) para o grupo tratado com 100 μM de NPS em relação aos grupos tratados com heparina e o controle ($4,7 \pm 0,1$, $4,3 \pm 0,1$ e $4,2 \pm 0,1$, respectivamente). A subpopulação de espermatozoides com MP intacta e acrossoma intacto diferiu ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais e após o descongelamento, porém essa diferença não foi observada ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos e após o descongelamento, o número de células com MP intacta e com acrossoma lesado, assim como não diferiu ($P > 0,05$) o total de células com MP lesada. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o método de lavagem por centrifugação favoreceu uma maior recuperação de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas e as concentrações de NPS utilizadas, possivelmente, não foram suficientes para induzirem a capacitação em espermatozoides criopreservados de caprinos.

Palavras-chave: seleção espermática, capacitação, nitroprussiato de sódio, caprinos.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of three spermatozoa selection methods and sodium nitroprusside (NPS) on different spermatoc parameters and capacitation of frozen-thawed goat semen. During the experiment of sperm selection, frozen-thawed spermatozoa of nine Saanen bucks were used. Three spermatoc selections methods were tested: Swim-up, Percoll density gradient and sperm wash or "whasing". The sperm motility, vigor, sperm plasma membrane integrity and acrossomal integrity were analyzed after and before the selection methods as well as the recovery rate. When induction of the capacitation was applied, seven frozen-thawed spermatozoa of Saanen bucks were submitted to induction by 10, 50 and 100 μM of NPS and heparin. The same parameters mentioned above were evaluated, except recovery rate. The integrity of acrosoma and sperm plasma membrane were evaluated by trypan blue/Giemsa staining. The results were analyzed by ANOVA and means compared by Student Newman Keuls. The Percoll method recovered more ($P < 0.05$) spermatozoa ($28.1 \pm 3.3\%$) and with greater motility ($55.5 \pm 2.6\%$) than Swim-up ($2.27 \pm 0.3\%$ and $41.1 \pm 5.0\%$, respectively), but the spermatoc recovery rate was lower ($P < 0.05$) than sperm wash ($43.3 \pm 3.8\%$). There was no difference ($P > 0.05$) among the three treatments for sperm plasma membrane integrity ($51.3 \pm 4.0\%$, $47.5 \pm 2.3\%$ and $47.1 \pm 3.3\%$ for Swim-up, Percoll and sperm wash, respectively). However, the proportion of spermatozoa with intact plasma membrane and injured acrosoma was higher ($P < 0.05$) for Swim-up than the other methods ($4.0 \pm 0.8\%$, $1.8 \pm 0.3\%$ and $2.5 \pm 0.4\%$ at Swim-up, Percoll and sperm wash, respectively). The motility after thawed ($57.6 \pm 2.4\%$) was higher ($P < 0.05$) than all groups submitted to capacitation induction ($34.3 \pm 3.1\%$, $36.2 \pm 3.1\%$ and $38.3 \pm 3.5\%$, for 10, 50 and 100 μM , respectively). There was difference ($P < 0.05$) for motility between the groups submitted to 100 μM of NPS ($38.3 \pm 3.5\%$) and heparin ($28.1 \pm 3.6\%$). Concerning to vigor, there was difference ($P < 0.05$) among the groups submitted to NPS (4.5 ± 0.1 , 4.5 ± 0.1 and 4.7 ± 0.1 , for 10, 50 and 100 μM , respectively) and after thawing (3.3 ± 0.1). Vigor was found bigger ($P < 0.05$) for group submitted to 100 μM of NPS if comparing to the group submitted to heparin and control (4.7 ± 0.1 , 4.3 ± 0.1 and 4.2 ± 0.1 respectively). It was observed difference ($P < 0.05$) at the rate of cells with intact plasma membrane and intact acrosoma among tested groups and after thawing, but such difference was not observed ($P > 0.05$) among the groups themselves. There was no difference ($P > 0.05$) among the groups and after thawing for the rate of spermatozoa with intact plasma membrane and injured acrosoma, as well as, there was no difference ($P > 0.05$) for the total of cells with injured plasma membrane. According to the results obtained in this study, we can suggest that sperm wash foments a bigger recovery of spermatozoa with intact plasma membrane and intact acrosoma and the concentrations of NPS used, probably were not enough to induce the sperm capacitation of frozen-thawed buck spermatozoa.

Keywords: sperm selection, capacitation, sodium nitroprusside, goat.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	p. 14
2 REVISÃO DE LITERATURA	p.16
2.1 ESPERMATOGÊNESE E MATURAÇÃO ESPERMÁTICA	p.16
2.2 ESTRUTURA ESPERMÁTICA	p.18
2.2.1 Cabeça	p.18
2.2.2 Cauda	p.19
2.2.3 Membrana celular	p.20
2.3 FATORES QUE ALTERAM A ESTRUTURA DAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS	p.21
2.4 CAPACITAÇÃO E HIPERATIVAÇÃO DE MOTILIDADE	p.23
2.5 REAÇÃO ACROSSOMAL E FECUNDAÇÃO	p.27
2.6 AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA	p.29
2.6.1 Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal	p.31
2.7 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES NA ESPÉCIE CAPRINA	p.36
2.7.1 Seleção espermática	p.38
2.7.2 Agentes indutores da capacitação <i>in vitro</i>	p.45
3 MATERIAL E MÉTODOS	p.51
3.1 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES	p.51
3.2 ANIMAIS	p.51
3.3 ENSAIO I – SELEÇÃO ESPERMÁTICA	p.51
3.3.1 Descongelamento do semen	p.51
3.3.2 Grupos experimentais	p.51
3.3.2.1 Gradiente de Percoll	p.53
3.3.2.2 “Swim-up”	p.54
3.3.2.3 Lavagem de espermatozoides por centrifugação	p.54
3.4 ENSAIO II – INDUÇÃO À CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA	p.55
3.4.1 Obtenção das substâncias indutoras da capacitação espermática	p.55
3.4.2 Grupos experimentais	p.55
3.5 RESPOSTAS AVALIADAS	p.59
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	p.61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	p.62

4.1 ENSAIO I – AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE SELEÇÃO ESPERMÁTICA, p.62

4.2 ENSAIO II – AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE INDUÇÃO À CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA, p.71

5 CONCLUSÃO, p.81

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.82

7 APÊNDICES, p.104

7.1 APÊNDICE A, p.104

7.2 APÊNDICE B, p.104

7.3 APÊNDICE C, p.105

8 ANEXOS, p.106

8.1 ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFF, p.106

8.2 ANEXO B – PREPARO DE MEIO TALP HEPES (TYRODE'S ALBUMIN-LACTATE-PYRUVATE), p.107

8.3 ANEXO C – PREPARO DE MEIO SPTL, p.108

8.4 ANEXO D – PREPARO AZUL TRIPAN 0,4%, p.109

8.5 ANEXO E – PREPARO GIEMSA, p.109

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 Grupos experimentais – Indução à capacitação espermática - Ensaio II, p. 57

Quadro 2 Classificação de espermatozoides por meio da técnica de coloração ATG, p. 60

Fig. 1 Esquema das avaliações após o descongelamento dos espermatozoides antes e após os métodos de seleção espermática, p.53

Fig. 2 Esquema das avaliações após o descongelamento e após a indução à capacitação, p.58

Fig. 3 Classificação dos espermatozoides após a coloração ATG. A: espermatozoides com membranas plasmáticas e acrossomal intactas. B: espermatozoide com membrana plasmática lesada e acrossoma intacto. C: espermatozoides com membranas plasmáticas e acrossomal lesadas. D: espermatozoide com membrana plasmática intacta e acrossoma lesado. Aumento de 1000X, p. 61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores espermáticos obtidos após a descongelação de espermatozoides de diferentes machos caprinos da raça Saanen (média \pm erro padrão), p.62

TABELA 2 - Valores espermáticos obtidos antes (pós-descongelação) e depois da realização de diferentes tratamentos para seleção espermática em espermatozoides congelados/descongelados de caprinos da raça Saanen (média \pm erro padrão), p.63

TABELA 3 - Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal obtidos antes (após o descongelamento) e depois da realização de diferentes tratamentos para seleção espermática em espermatozoides congelados/descongelados de caprinos da raça Saanen (média \pm erro padrão), p.63

TABELA 4 - Efeito da interação entre animal e método de seleção sobre os parâmetros de integridade de membranas plasmática e acrossomal de diferentes machos caprinos da raça Saanen (média \pm erro padrão), p.65

TABELA 5 - Valores espermáticos obtidos após a descongelação de espermatozoides de diferentes machos caprinos da raça Saanen (média \pm erro padrão), p.72

TABELA 6 - Valores espermáticos obtidos após o descongelamento e após diferentes protocolos de indução da capacitação espermática em diferentes machos caprinos da raça Saanen (média \pm erro padrão), p. 73

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	microgramas
µL	microlitro
µM	micromolar
AC	adenil ciclase
AMPc	monofosfato cíclico
ASMA	análise de morfometria espermática automatizada
ATG	azul tripan e Giemsa
CASA	computer assisted sperm analyses
ERRO	espécies reativas de oxigênio
FITC-PNA	isotiocianato de fluoresceína associada a <i>Peanut agglutinin</i>
FITC-PSA	isotiocianato de fluoresceína associada a <i>Pisum sativum</i>
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
G	gramas
INOS	óxido nítrico sintase induzível
IP	iodado de propídeo
LPC	lisofosfatidilcolina
MG	miligramas
MI	mililitro
mM	milimolar
MP	membrana plasmática
NOS	óxido nítrico sintase
NPS	nitroprussiato de sódio
ON	óxido nítrico
PBS	solução salina tamponada
PIVE	produção <i>in vitro</i> de embriões
PVP	polivinil pirrolidona
SPTL	Sperm Tyrode's Albumin-Lactate-Pyruvate
UI	unidade internacional
vs.	<i>versus</i>
x g	força gravitacional
ZP	zona pelúcida

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura apresenta um ciclo de crescimento mundial. Este crescimento intensificou-se nas últimas décadas, sobretudo em países em desenvolvimento, detentores dos maiores rebanhos. No período de 1981 a 1999, o rebanho caprino mundial cresceu 55%. Este crescimento foi acompanhado pelo aumento da produção mundial de leite de cabra, que cresceu 58% (Haenlein, 2004). A carne e o leite, em função de suas características ímpares, têm despertado crescente interesse por parte de consumidores, tornando a atividade muito atrativa. Acompanhando a tendência mundial, projeta-se uma multiplicação da ordem de cinco vezes o rebanho brasileiro atual para os próximos vinte anos (Fonseca, 2005).

O considerável crescimento da caprinocultura nacional está transformando o cenário dos nossos sistemas produtivos e tem requerido novos conhecimentos técnicos e científicos. Avanços tecnológicos dirigidos aos diversos segmentos repercutem no aumento da produção animal, sendo que as biotecnologias reprodutivas têm uma atuação direta na obtenção de maior número de animais de elevada qualidade (Paula et al., 2008).

A aplicação de tecnologias de reprodução assistida possibilita o incremento do desempenho do melhoramento genético. Algumas dessas técnicas aumentam a seleção diferencial, como a inseminação artificial e a transferência de embriões, enquanto outras aceleram o progresso encurtando o intervalo entre gerações, como a produção *in vitro* de embriões (PIVE) (Baldassarre e Karatzas, 2004). Estas biotecnologias permitem uma maior produção no número de descendentes daqueles animais de elevado mérito genético do que seria possível pela reprodução natural.

Atualmente, o método de eleição para a produção de embriões caprinos é a produção *in vivo*, a qual resulta em embriões com elevada capacidade de desenvolvimento, porém caracteriza-se por um elevado grau de variabilidade da resposta das doadoras e dos estádios embrionários (Baldassarre e Karatzas, 2004).

Nesse sentido, a PIVE em caprinos vem avançando rapidamente. A aplicação de técnicas *in vitro* (maturação, fertilização e cultivo) para a espécie caprina, pode facilitar a produção de um grande número de embriões a partir de uma única fêmea

doadora. Somando-se a essa situação, a utilização de animais pré-puberes, em que a colheita de oócitos é realizada em idade precoce, pode reduzir o intervalo de gerações e, conseqüentemente, acelerar a propagação de animais valiosos (Baldassarre et al., 2002; Baldassarre e Karatzas, 2004).

A PIVE nos pequenos ruminantes tem importância fundamental, principalmente por fornecer material para a pesquisa básica a custo baixo e possibilitar a introdução comercial de biotécnicas como a transferência nuclear e a produção de animais transgênicos (Baldassarre et al., 2002; Cognié et al., 2003).

O processo da PIVE consiste de várias etapas interdependentes que se não forem realizadas de forma adequada podem comprometer o seu sucesso. Dentre os diversos fatores que afetam o sistema de PIVE encontra-se basicamente a qualidade dos oócitos (Lonergan e Fair, 2008) e dos espermatozoides utilizados na fertilização *in vitro* (FIV) (Hanssem, 2006), além das condições de cultivo (Lonergan e Fair, 2008). O uso de fatores de crescimento, aminoácidos, diferentes tipos de energia, assim como o conhecimento do requerimento de oxigênio e temperatura têm sido investigados na tentativa de melhorar as taxas de produção de blastocistos (Cognié et al., 2004). Todavia, as técnicas de preparação espermática recebem pouca atenção.

Métodos de preparação espermática são rotineiramente utilizados nos sistemas de FIV de várias espécies. Estes métodos têm o objetivo de aumentar a qualidade espermática e, ao mesmo tempo, iniciar a capacitação espermática (Parrish et al., 1995; Rodriguez-Martinez et al., 1997). Estudos caracterizam a qualidade espermática por intermédio da concentração e motilidade, além da integridade de membranas plasmática e acrossomal, as quais podem ser avaliadas por métodos de coloração fluorescente (Silva e Gadella, 2006). Em contraste às numerosas comparações de tratamento espermático para a FIV em bovinos e humanos, poucos estudos foram relatados em caprinos.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo aperfeiçoar a etapa de preparação espermática na espécie caprina, a fim de aprimorar o protocolo de seleção e indução da capacitação espermática, melhorando a qualidade dos espermatozoides, e conseqüentemente, possibilitando o sucesso da PIVE em caprinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESPERMATOGÊNESE E MATURAÇÃO ESPERMÁTICA

A espermatogênese é um longo, mas ordenado processo em que os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos. Esta é dividida em três fases: a fase proliferativa, chamada espermatocitogênese, em que a célula primária diplóide, a espermatogônia, passa por repetidas divisões mitóticas para dar origem aos espermatócitos; a fase meiótica em que o material genético do espermatócito recombina e segrega para formar a célula haplóide redonda ou espermátide; e a fase espermiogênica em que a espermátide sofre a diferenciação que dará origem a espermátides alongadas, de núcleo condensado e flagelo espécie-específico determinando assim que o espermatozoide seja liberado para o epidídimo. Para que esta última fase ocorra, as espermátides sofrem uma série de transformações que incluem a formação do complexo de Golgi, da cabeça, do acrossoma e a aquisição da capacidade de fertilizar o oócito (Johnson et al., 1997).

As modificações pelas quais as espermátides passam, incluem condensação da cromatina nuclear, formação da cauda do espermatozoide ou aparelho flagelar e desenvolvimento do acrossoma (Hafez e Hafez, 2004). A transformação final das espermátides consiste na maturação das células espermáticas que serão liberadas para dentro do lúmen dos túbulos seminíferos, em um processo chamado espermição. Nesse processo, uma grande fração do citoplasma é eliminada, quando o espermatozoide é liberado no lúmen dos túbulos seminíferos. O restante do citoplasma permanece ligado ao colo do espermatozoide formando a gota citoplasmática, que é posteriormente eliminada durante a passagem do espermatozoide pelo epidídimo (Garner e Hafez, 2004).

Os espermatozoides que são liberados para a luz do túbulo seminífero ainda não são capazes de fecundar e adquirem esta capacidade quando chegam ao epidídimo. As modificações funcionais que ocorrem durante o trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo implicam na maturação de várias e diferentes organelas celulares, absorção e/ou integração de glicoproteínas epididimárias, além da aquisição do movimento progressivo e habilidade para ligar-se à zona pelúcida (ZP), processo denominado de maturação espermática (Thibault e Levasseur, 1992).

Durante a maturação epididimária, ocorrem modificações bioquímicas na composição lipídica da membrana plasmática (MP) dos espermatozoides que têm como objetivo promover a estabilização desta, permitindo seu armazenamento no epidídimo e seu posterior transporte nos tratos reprodutivos do macho e da fêmea. Esta maturação fornece aos espermatozoides a capacidade fecundante a partir do estabelecimento da organização molecular necessária à capacitação e fertilização, quando estes entram em contato com os fluidos do sistema reprodutivo da fêmea (Parks e Hammerstedt, 1985).

As modificações ocorridas durante a maturação espermática ocorrem por meio da exposição sequencial e sincronizada destas células a diferentes componentes do fluido do epidídimo. A maior parte dessas modificações é induzida por novas proteínas presentes nesse fluido ou por modificações de proteínas já existentes, criando novos sítios de ligação à estrutura oocitária ou exposição de sítios pré-existentes (Dacheux et al., 2006).

O fluido da cauda do epidídimo é rico em β -galactosidases, e uma série de glicosidases, que auxiliam na maturação espermática. Estas proteínas modificam glicoproteínas presentes na membrana espermática ou se ligam a essa membrana, atuando como sítios de ligação a carboidratos. A remoção desses resíduos da ZP promove o bloqueio da ligação aos espermatozoides, sugerindo que essa enzima liga-se às células durante a maturação epididimária (Dacheux et al., 2006).

Os fatores decapacitantes presentes no plasma seminal estão relacionados com proteínas que participam de processos de proteção dos espermatozoides durante o trânsito epididimário e o armazenamento na cauda deste órgão por ocasião da ejaculação no trato reprodutor da fêmea (Hinton et al., 1995). Esses agentes decapacitantes protegem a célula de uma capacitação precoce (Gadella et al., 2001).

O plasma seminal também apresenta ação na maturação espermática, evitando que a reação acrossomal ocorra prematuramente. Isto ocorre devido aos fatores decapacitantes presentes no plasma seminal que previnem o desencadeamento do processo de capacitação dos espermatozoides auxiliando na estabilização da MP, tanto pela maturação da razão colesterol/fosfolípídeos quanto

pelo bloqueio da camodulina, a qual facilita o transporte transmembrana de cálcio (Fraser, 1998).

A albumina seminal possui a capacidade de absorver peróxidos de lipídios, contribuindo com efeito protetor da membrana espermática e apresenta correlação positiva entre a porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais no ejaculado de bovinos (Elzanaty et al., 2007).

Para combater a ação deletéria de radicais livres originados por processos catabólicos da célula, o epidídimo secreta enzimas antioxidantes, dentre as quais glutathione S-transferase, tioredoxina peroxidase, superóxido desmutase, glutathione peroxidase e catalase. A glutathione peroxidase constitui um dos principais meios enzimáticos de proteção espermática, estando presente no fluido epididimário e na membrana do espermatozoide (Dacheux et al., 2006).

2.2 ESTRUTURA ESPERMÁTICA

Os espermatozoides dos mamíferos, quando liberados, são células equipadas com um forte flagelo que os impulsionam através de um meio aquoso e não apresentam organelas citoplasmáticas, tais como ribossomos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Por outro lado, os espermatozoides possuem várias mitocôndrias a fim de proporcionar energia ao flagelo de modo eficiente. Estes são células alongadas, haplóides, consistindo em uma cabeça achatada contendo um núcleo e de uma cauda recoberta por uma MP (Alberts et al., 1997). O espermatozoide de pequenos ruminantes tem forma de clava e mede aproximadamente 9 µm de altura por 5 µm de diâmetro (Derivaux, 1980).

2.2.1 Cabeça

A cabeça do espermatozoide, em geral, é constituída por acrossoma e núcleo, sendo o acrossoma uma organela originada a partir do complexo de Golgi e com enzimas hidrolíticas em seu interior, tais como pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas. Essas enzimas são liberadas durante o processo de reação acrossomal para que haja a penetração do espermatozoide no oócito (Pesch e Bergmann, 2006), devendo o acrossoma se manter íntegro até que a zona de ligação entre o gameta masculino e o feminino esteja completa (Silva e Gadella, 2006).

O acrossoma se dispõe sobre o núcleo na porção anterior da cabeça do espermatozoide, sendo contido pela membrana acrossomal interna e membrana acrossomal externa. A membrana acrossomal interna fica em contato com a membrana nuclear, enquanto a membrana acrossomal externa está em contato com o lado interno da MP. Durante a reação acrossômica, a membrana acrossomal externa e a MP se fundem e formam vesículas, liberando o conteúdo acrossomal. A membrana acrossomal interna e o segmento equatorial persistem até a fusão do espermatozoide com o oócito (Flesch e Gadella, 2000).

O núcleo do espermatozoide retém a cromatina condensada com as informações genéticas que irão constituir o genoma de um novo indivíduo, após fertilização, sendo a integridade desta estrutura indispensável para que haja o perfeito desenvolvimento embrionário e para que a gestação seja levada a termo (Moraes et al., 1998).

2.2.2 Cauda

A cauda é a porção mais longa do espermatozoide e é composta pelas peças intermediária, principal e final (Pesch e Bergmann, 2006).

A peça intermediária estende-se do ponto de união da cauda com a cabeça espermática (colo) até o final da hélice mitocondrial. A principal função fisiológica das mitocôndrias, presentes nesta região da cauda, é disponibilizar energia pela produção de ATP (adenosina trifosfato) via fosforilação oxidativa (Manella, 2000).

O colo é uma curta porção que se encontra entre a peça intermediária da cauda e a cabeça, que apresenta a função de ligar essas duas estruturas. É composta por uma região articulada chamada de *capitulum*, a qual é fixada à membrana basal do núcleo por uma série de delicados filamentos (Pesch e Bergmann, 2006).

Não mais se encontram estruturas mitocondriais na peça principal, mas há continuidade dos filamentos do axonema, recoberto por uma bainha fibrosa fenestrada. A bainha fibrosa é uma estrutura do citoesqueleto que rodeia o axonema e as fibras densas externas, fornecendo um suporte no controle e restrição do movimento flagelar (Mortimer, 1997).

2.2.3 Membrana celular

A estrutura básica da MP de qualquer célula é o mosaico fluido, constituído por dupla camada lipídica entremeada por moléculas de proteína (Singer e Nicholson, 1972). Desta forma, as membranas apresentam-se em um estado líquido, sendo esta característica um pré-requisito para o desempenho de suas funções. Os principais fatores que afetam esta fluidez é a relação entre fosfolípidios e colesterol e a temperatura à qual a membrana está exposta (Hammerstedt et al., 1990).

A MP dos espermatozoides envolve toda a célula, mantendo todos seus componentes intracelulares e organelas juntos e, devido a suas características semipermeáveis, mantêm um gradiente químico adequado de íons e outros componentes solúveis. A MP consiste em cinco domínios específicos: acrossoma, segmento equatorial, segmento basal, região intermediária e cauda, sendo essas regiões diferenciadas de acordo com suas diferentes funções fisiológicas (Ladha, 1998).

Ao contrário do que é observado nas células somáticas de mamíferos, há uma alta proporção de lipídeos e proteínas nas membranas espermáticas. Os lipídeos são distribuídos assimetricamente pela membrana e são compostos em sua maioria por glicolipídeos, fosfolipídeos, assim como colesterol. Os fosfolipídeos podem ser divididos em fosfoglicerolipídeos e esfingomielina, os quais juntos representam mais de 50% dos lipídios de membrana, e suas proporções são espécies dependentes (Alberts et al., 1997).

O colesterol presente nas membranas espermáticas limita a permeabilidade de íons e a fluidez da bicamada de fosfolipídeos, assim como estabiliza a membrana prevenindo processos envolvidos na capacitação. O afluxo e/ou a redistribuição do colesterol causa a desestabilização das membranas espermáticas induzindo dessa forma a capacitação (De Lamirande et al., 1997b). Este elemento está relacionado com a taxa de capacitação e, durante esse processo, encontra-se em grandes quantidades no plasma seminal. Esse composto é o componente que mais varia na composição da membrana espermática (Yanagimachi, 1994).

As proteínas específicas da MP facilitam o transporte de glicose e frutose do meio extracelular para o espermatozoide, sendo a glicose e frutose fontes indispensáveis de substrato energético (Silva e Gadella, 2006). No exterior da célula,

as proteínas integrais que atravessam a membrana, e as proteínas periféricas, ancoram oligossacarídeos que formam o glicocálix, que tem como função proteger a membrana e interagir com substâncias vizinhas que entram em contato com esta (Alberts et al., 1997).

A estrutura das membranas plasmática, nuclear e acrossomal da célula espermática são construídas durante a espermatogênese e modificadas durante o trânsito e armazenamento no epidídimo (Flesch e Gadella, 2000).

A integridade da MP deve ser preservada e avaliada, uma vez que exerce papel essencial na sobrevivência do espermatozoide e na manutenção de sua capacidade fecundante (Graham et al., 1990).

2.3 FATORES QUE ALTERAM A ESTRUTURA DAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS

Mesmo com as melhores técnicas atuais de preservação, obtém-se, em média, 50% de viabilidade da população espermática após a descongelamento (Watson, 1995). Por ser uma célula complexa, o espermatozoide torna-se infértil quando um de seus fatores bioquímicos ou morfológicos é afetado. A avaliação de somente um desses aspectos não garante a condição de normalidade do outro. Portanto, a combinação de vários fatores em uma análise multifatorial é mais apropriada para diagnóstico da funcionalidade e integridade do espermatozoide (Melo e Henry, 1999).

A congelamento dos espermatozoides oferece notáveis benefícios práticos à reprodução, particularmente pela formação dos bancos de germoplasma, uma vez que o frio é o promotor mais eficiente do estado de anabiose (Holt, 2000).

A avaliação da integridade das membranas espermáticas é um indicador importante sobre o sucesso do processo de criopreservação, uma vez que estas são extremamente sensíveis às crioinjúrias. Em condições de estresse provocado pela criopreservação, as membranas podem sofrer rearranjo, formando pontos vulneráveis e, com isso, induzir a excessiva permeabilidade ou mesmo rompimento da membrana (Holt et al., 1992). Durante esse processo, a célula está sujeita aos estresses químicos, osmóticos, térmicos e mecânicos, sendo que estes são

originados, principalmente, nas fases de resfriamento e descongelamento dos espermatozoides (Rasul et al., 2001).

A morte do espermatozoide durante o processo de descongelação ocorre como consequência das mudanças físico-químicas que se processam no meio diluidor e principalmente no próprio espermatozoide, devido a danos provocados em sua ultra-estrutura que inviabilizam a sua sobrevivência. O desafio celular, durante a congelação e descongelação não é a capacidade da célula de suportar a temperatura muito baixa, mas sim a de atravessar uma das fases críticas do processo que vai de -15 a -60° C, no qual a célula tem que passar duas vezes, ou seja, durante a congelação e descongelação (Mazur, 1985).

Os eventos físicos que ocorrem na célula dependem da velocidade de congelação. Quando o processo de congelação é muito lento, ocorre a congelação da água extracelular com a consequente concentração de soluto, colocando a célula momentaneamente em um meio hipertônico, fazendo com que esta perca água rapidamente, o que leva a desidratação celular e ao aumento na concentração de soluto intracelular, promovendo assim, sua morte. Por outro lado, quando a célula é congelada rapidamente, não há perda de água, promovendo com isso a formação de cristais de gelo intracelular, causando lesões nas estruturas celulares, fato que compromete a função celular (Mazur, 1985).

Há ainda, evidências de que as células descongeladas sofrem lesões durante o reaquecimento. Esse fato foi reconhecido como resultante da recristalização de cristais de gelo microscópicos (Fiser e Faifull, 1989).

Nos últimos anos, muitas pesquisas avaliaram danos na estrutura celular, demonstrando que as modificações que ocorrem durante a criopreservação são similares àquelas que ocorrem durante o processo de capacitação espermática. Devido a esse fato, o termo "criocapacitação" é utilizado. A capacitação que ocorre durante a criopreservação deve ser estudada, uma vez que as alterações que ocorrem nesse processo diminuem o tempo de vida dos espermatozoides. O curto tempo de vida das células espermáticas criopreservadas dentro do trato reprodutivo da fêmea é um problema particular, principalmente em espécies que apresentam estro longo, como a equina, havendo a necessidade de um controle mais rígido do momento da ovulação e da inseminação (Thomas et al., 2006).

Alterações na estrutura e na integridade da MP é um ponto importante na redução da fertilidade dos espermatozoides descongelados (Thomas et al., 2006). A composição lipídica da MP é assimétrica na maioria dos mamíferos, apresentando moléculas de fosfatidilcolina e esfingomiéline concentradas na parte externa da bicamada e fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina concentradas na parte interna. No processo de capacitação e criopreservação dos espermatozoides, ocorre uma translocação dessas moléculas na MP, resultando na exteriorização das moléculas de fosfatidilserina e de fosfatidiletanolamina. A este processo de translocação de moléculas, dá-se o nome de "scrambling" (De Lamirande et al., 1997b).

A translocação lipídica dá-se quando a membrana passa pela fase de transição gel – cristalina, a qual favorece o deslocamento das proteínas para a região mais fluída da membrana (que ainda não se cristalizou), permitindo que os lipídios dessa região invertam sua posição polar-apolar. Essa translocação de fosfolipídeos é atrelada a uma desordem lipídica tendo como consequência o aumento da fluidez da membrana e sua instabilidade. A alteração da fluidez está relacionada com a função do colesterol de manter a MP estável, impedindo o aumento da fluidez da membrana. No entanto, o efluxo de colesterol durante a capacitação *in vitro* aumenta a desordem da membrana resultando na formação de poros na membrana fazendo com que esta perca sua função de permeabilizar a célula, tornando-a vulnerável à perda e entrada de íons, descontrolando seu equilíbrio osmótico (Parks e Graham, 1992; Watson, 1995).

Dessa forma, assim como na capacitação, a criopreservação leva a membrana a um maior estado de fluidez e exposição de sítios de ligação a moléculas externas, facilitando ou requerendo menor tempo para a célula se capacitar (Thomas et al., 2006).

2.4 CAPACITAÇÃO E HIPERATIVAÇÃO DE MOTILIDADE

Os espermatozoides ejaculados dos mamíferos não são capazes de fecundar oócitos, mesmo apresentando motilidade e aparente normalidade morfológica. Eles adquirem esta capacidade no trato genital feminino num processo tempo dependente, denominado de capacitação (De Lamirande et al., 1997b). A capacitação espermática é de fundamental importância para que os

espermatozoides tornem-se aptos para fecundar e consiste na remoção ou alterações de substâncias que estabilizam a MP dos espermatozoides. Dentre os processos envolvidos, destacam-se modificações da fluidez e da morfologia da MP e alterações do fluxo de íons e do pH intracelular. Além disso, também ocorrem alterações das glicoproteínas periféricas, rearranjo das proteínas integrais, redução da quantidade de colesterol e mudanças na distribuição e composição dos fosfolipídeos que estão associados à reação acrossomal (Blondin et al., 2009).

O processo fisiológico da capacitação é considerado como um passo de maturação sendo um processo de ativação, onde os espermatozoides permanecem dentro do trato reprodutivo da fêmea havendo retirada das substâncias protetoras do plasma seminal e seleção dos espermatozoides competentes. Ainda existem algumas controvérsias sobre a definição da capacitação, já que alguns estudos incluem o evento de reação acrossomal nesse processo, enquanto outros autores não o incluem (Chang, 1984).

A capacitação é um fenômeno reversível, no qual o uso de substâncias específicas ou fluidos biológicos, como o plasma seminal, reduz a habilidade de fertilização dos oócitos, “decapacitando” essas células. Com isso, a incubação no trato genital da fêmea é necessária para solucionar a inibição e “recapacitar” o espermatozoide (Bedford e Chang, 1962).

A função da capacitação é fornecer a fluidez necessária para que ocorram hiperativação da motilidade e fusão entre as membranas plasmática e acrossomal externa, denominada de vesiculação, culminando na reação acrossômica. As alterações ocorridas na MP durante a capacitação são capazes de aumentar a afinidade das células à ZP (Gadella et al, 2001).

Na tuba uterina, os espermatozoides provocam importantes alterações na síntese protéica das células epiteliais. A liberação dessas novas proteínas tem papel importante na capacitação. A ligação de algumas dessas proteínas está relacionada à hiperativação da motilidade. Além disso, alguma dessas proteínas são cálcio dependentes, causando uma estabilização das membranas celulares pela ligação com os espermatozoides no istmo, onde a concentração de cálcio é alta. Em seguida, promovem a capacitação por serem removidas lentamente do

espermatozoide na ampola (local da fertilização) onde a concentração de cálcio é menor (Lapointe e Sirard, 1996).

Como dito anteriormente, a hiperativação é um fenômeno cálcio-dependente, que altera o padrão de motilidade do espermatozoide e ocorre no sítio de fertilização, determinando uma maior amplitude de batimento flagelar, aumento da flexibilidade da região proximal da peça intermediária, tendo uma maior velocidade curvilínea, deslocamento lateral da cabeça, e menor linearidade (Mortimer, 1997).

A hiperativação permite uma passagem mais facilitada pela tuba uterina, ajudando na orientação do espermatozoide ao local de fecundação, e propicia uma penetração mais eficiente no oócito. Mesmo que a capacitação e a reação acrossomal permitam a ligação do espermatozoide ao oócito, a hiperativação é indispensável para a penetração na ZP (De Lamirande et al., 1997b).

Durante o processo de hiperativação, há aumento das concentrações de cálcio intracelular, que é maior que a concentração necessária durante a reação acrossomal. O aumento de cálcio na porção flagelar caracteriza o batimento assimétrico do flagelo nesse evento (Suarez e Dai, 1995). Suarez et al. (1993), mostraram que esse batimento cíclico desordenado está relacionado com uma rápida oscilação de cálcio detectada na porção proximal da peça intermediária.

Alterações nas concentrações de íons são somente uma parte das complexas alterações que os espermatozoides sofrem durante a hiperativação. Além disso, há modificações no axonema, que estão relacionadas com a fosforilação de proteínas que por sua vez estão envolvidas na motilidade espermática (Leclerc et al., 1997).

O fenômeno de hiperativação precisa ser sincronizado ao momento da ovulação e precisa ocorrer no local exato. Esse fenômeno pode acontecer de forma prematura e ocorre em 18% dos homens inférteis (De Lamirande e Gagnon, 1995).

Um dos compostos considerados importantes no desencadeamento da capacitação é o bicarbonato. Esta substância encontra-se em baixa concentração na cauda do epidídimo, local onde ficam armazenados os espermatozoides por períodos longos. Quando chegam ao trato genital feminino, os espermatozoides entram em contato com o bicarbonato. Uma das funções do bicarbonato de sódio é aumentar o pH intracelular e estimular a adenil ciclase (AC), afetando a função espermática. Ao estimular a AC, ocorre um aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que estimula a proteína quinase A. Essa proteína induz

a fosforilação da tirosina, metabolizando várias proteínas da matriz extracelular e da membrana e, por fim, expõe sítios de ligação à ZP predispondo a célula à reação acrossômica (Gadella et al., 2001).

Segundo Flesh et al. (2001), o bicarbonato induz a redistribuição lateral do colesterol da MP, facilitando a extração do lipídio pela albumina. A eliminação do colesterol é uma das últimas etapas deste processo, e resulta na capacitação, hiperativação e reação acrossômica.

O influxo de cálcio é uma etapa essencial para a capacitação e reação acrossomal nos espermatozoides de mamíferos, por inativar a bomba de sódio-potássio-ATPase, resultando em rápido aumento de sódio intracelular, efluxo do íon hidrogênio e aumento do pH intracelular. O aumento da concentração intracelular de cálcio também ativa as fosfolipases da membrana que produzem substâncias fusogênicas, como o ácido araquidônico e os lisofosfolipídios (De Lamirande e O'Flaherty, 2008). O colesterol presente nas membranas espermáticas, limita a permeabilidade iônica, a inserção de proteínas e a mobilidade na bicamada de fosfolipídeos, assim como enrijece e estabiliza as membranas, dessa forma, previne alguns eventos associados à capacitação. Na tuba uterina, ocorre o efluxo de colesterol em decorrência de sua transferência para albuminas e lipoproteínas, alterando as propriedades biofísicas da membrana espermática para um estado mais fusogênico. Com a retirada do colesterol, as proporções entre esse elemento e os fosfolipídios nas membranas plasmáticas e acrossomal externa diminuem, havendo uma difusão lipídica, aumentando a fluidez da bicamada. Com isso, há uma exposição de antígenos específicos para ligação de proteínas contidas na ZP, no momento da fecundação (De Lamirande et al., 1997b).

As proteínas ligantes possuem uma grande afinidade para MP, mais especificamente para agregados de fosfatidilcolina. Essas proteínas possuem capacidade de auxiliar o deslocamento das moléculas de colesterol da superfície espermática auxiliando a capacitação espermática (Therien et al, 1998).

Os glicosaminoglicanos são carboidratos, que estão presentes na matriz extracelular, e são componentes integrais de membranas celulares. Têm sido identificado no trato reprodutor feminino, obstruindo receptores, para regular a viabilidade de substratos e de fatores de crescimento (Ax e Lenz, 1987). A capacitação espermática ocorre no trato reprodutivo feminino, sempre diante de

altas concentrações de glicosaminoglicanos do fluido folicular ovariano, ou de outras fontes, sendo sempre pré-requisito para a reação acrossômica (Parrish et al., 1989).

A função dos glicosaminoglicanos neste evento, se dá pelo aumento do pH intracelular, no aumento da entrada de cálcio na célula, na fosforilação da tirosina e no “scrambling” dos fosfolípidos (Parrish et al., 1988; Lukoseviciute et al., 2005).

2.5 REAÇÃO ACROSSOMAL E FECUNDAÇÃO

A taxa de concepção depende da probabilidade dos espermatozoides ejaculados passarem por completa modificação morfológica, bioquímica e biofísica, capacitando-se e permitindo a reação acrossomal quando em contato com a ZP do oócito. Por isso, avaliar a integridade do acrossoma é imprescindível para determinar a qualidade espermática, pois a reação acrossomal precisa ocorrer em sincronismo com o momento da fecundação (Yanagimachi, 1989).

O processo de capacitação culmina com a reação do acrossoma, mediado por enzimas e proteínas localizadas na superfície da MP do espermatozoide e a ZP do oócito. A capacitação espermática e a reação acrossomal são dois processos que os espermatozoides sofrem durante sua passagem pelo trato genital da fêmea, tornando-os hábeis para fecundar o oócito. Com a reação do acrossoma há liberação de enzimas digestivas que conferem ao espermatozoide habilidade para penetrar às células da ZP (Yanagimachi, 1994).

A reação acrossômica consiste de uma elevação intra-espermática de mediadores iônicos de excitação que incluem o cálcio. Em um estágio inicial, a reação do acrossoma se dá por eventos de fusão de múltiplas membranas envolvendo a membrana acrossomal externa e MP que a recobre, o que resulta na formação de vesículas híbridas originárias de ambas as membranas e na perda do conteúdo acrossomal. Em um estágio mais adiantado, as vesículas híbridas são eliminadas da superfície dos espermatozoides e ocorre uma liberação mais intensa de conteúdo acrossomal, que inclui uma variedade de enzimas proteolíticas e hidrolíticas, acrosina e hialuronidase que são essenciais para que tornem capaz a penetração do espermatozoide no oócito (Frits et al., 2000).

A criopreservação eleva os níveis de cálcio intracelular, assim como a capacitação. Conseqüentemente, a reação acrossomal em espermatozoides provenientes de amostra congelada/descongelada pode ser realizada em tempo menor que o necessário para sua indução *in natura* nos órgãos genitais da fêmea (O'Flaherty et al., 1999; Watson, 2000).

Após a reação do acrossoma, receptores espermáticos são expostos, e se ligam a glicoproteína da ZP (ZP2) e com o auxílio das enzimas que foram liberadas e da hipermotilidade, o espermatozoide ultrapassa a ZP (Wassarman et al., 2001).

Após passar a ZP, a região equatorial do espermatozoide ainda permanece intacta. O espermatozoide então, já no espaço perivitelínico do oócito, através da região equatorial, se liga à MP do oócito e é incorporado ao citoplasma do mesmo (Areekijserree e Veerapraditsin, 2007). Se a reação acrossomal é iniciada antes da ligação do espermatozoide à ZP, as enzimas são perdidas e o espermatozoide não é capaz de ultrapassar a ZP e de fecundar o oócito (Gadella et al., 2001).

Concomitantemente à penetração do espermatozoide, também ocorre à ativação do oócito, iniciando uma série de eventos morfológicos e bioquímicos. Esta ativação leva a um aumento do pH intracelular, aumento do cálcio e a diminuição do sódio, causando uma despolarização do oócito. Essa despolarização causa exocitose dos grânulos corticais, que levam a modificações na ZP, causando o chamado bloqueio da zona, ou bloqueio à poliespermia, que previne a entrada de outros espermatozoides. Tais modificações consistem na hidrólise parcial da ZP3 e da ZP2 (Yanagimachi, 1994). Além disso, o oócito também é estimulado a completar a segunda divisão meiótica, com expulsão do segundo corpúsculo polar. Os cromossomos restantes são envolvidos por uma membrana nuclear, formando o pró-núcleo feminino (Palma et al., 2001).

Imediatamente após a penetração espermática, as proteínas perinucleares que formam o envelope nuclear, são dissolvidas no citoplasma pela ação de fatores citoplasmáticos e das microvilosidades do oócito (Sutovsky et al., 1997). Inicia-se a descondensação do material nuclear, que ocorre após a redução das pontes dissulfídicas das protaminas nucleares e substituição dessas por histonas. A

cromatina nuclear descondensa, surge uma nova membrana nuclear formando o pró-núcleo masculino (Yanagimachi, 1994).

2.6 AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

A avaliação *in vitro* dos espermatozoides é uma ferramenta importante na determinação da capacidade reprodutiva de um macho como reprodutor, em virtude de complementar as informações obtidas durante a realização do exame clínico (Rodriguez-Martinez, 2006).

Considerando que, *in vivo*, espermatozoides potencialmente férteis são continuamente submetidos a obstáculos no processo de seleção, antes e durante da fertilização, as informações proporcionadas pelos métodos laboratoriais de avaliação da integridade e da função espermática são de grande importância, por correlacionar os parâmetros de qualidade espermática com os resultados de fertilidade. Conseqüentemente, estas avaliações podem auxiliar nas aplicações comerciais, como seleção de animais de alto valor genético devido à alta qualidade espermática, visando a sua utilização em técnicas reprodutivas, na constituição de bancos de germoplasma, bem como da conservação de material genético de animais em vias de extinção (Batista e Guerra, 2010).

Sendo assim, o desenvolvimento de ensaios laboratoriais para prever a capacidade fecundante dos espermatozoides tem instigado há muitos anos os pesquisadores. Entretanto, nenhum teste laboratorial isolado pode estimar o potencial de fertilidade espermática. Por essa razão, têm ocorrido grandes avanços no estudo da célula espermática, permitindo o desenvolvimento de muitas técnicas para avaliar outros aspectos do espermatozoide (Arruda et al., 2003).

Tradicionalmente, além de volume e aspecto, a análise espermática inclui a determinação de concentração, motilidade, vigor e morfologia espermática, rotineiramente realizada por microscopia de luz convencional. As limitações destes métodos incluem subjetividade, variabilidade, reduzido número de espermatozoides analisados e pobre correlação com o potencial fertilizante destes gametas (Verstegen et al., 2002).

A motilidade espermática é a técnica mais utilizada na rotina laboratorial e continua tendo grande valor, principalmente para diferenciar espermatozoides de baixa e alta qualidade. A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é importante devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (Verstegen et al., 2002).

A alteração morfológica é uma das características que mais se correlaciona com fertilidade. As anormalidades morfológicas são classificadas de diversas formas, sendo que algumas classificações dividem as alterações de acordo com a região da célula onde a mesma ocorreu como: cabeça, peça intermediária ou cauda. Outras simplesmente dividem os defeitos em primários e secundários, ou defeitos maiores e menores (Bloom, 1973), de acordo com o prejuízo causado à fertilidade. Posteriormente, Saacke et al. (1990) propuseram um novo modelo de classificação espermática, sendo defeitos compensatórios, que estão relacionados com incapacidade ou dificuldade de chegar ao local de fecundação e defeitos não compensatórios, que estão relacionados com a incapacidade de fecundação do oócito.

Para avaliação de rotina das características morfológicas dos espermatozoides, são utilizadas duas técnicas principais: esfregaços corados em microscópio de campo claro e preparação úmida com microscópio de contraste de fase (Freneau, 2011).

Sistemas de análises computadorizadas têm substituído a avaliação espermática por microscopia de luz convencional, uma vez que proporcionam informações mais detalhadas e objetivas sobre várias características da motilidade e da morfometria (Verstegen et al., 2002)

Em 1992, surgiu o HTM-IVOS Sperm Analyzer[®], um sistema integrado de computador e microscópio que permite a aquisição de imagens digitalizadas, fornecendo classificação automática dos movimentos espermáticos, informando porcentagem de móveis, média de velocidade e porcentagem de progressivos. Diversos sistemas de análises computadorizadas da motilidade espermática (Computer Assisted Sperm Analyses - CASA) têm sido propostos e aplicados na tentativa de minimizar os efeitos da avaliação convencional dos espermatozoides,

além de incrementar o estudo da andrologia de várias espécies animais (Verstegen et al., 2002).

Estes sistemas oferecem informações sobre a cinética espermática, com a utilização de campos de vídeo contendo imagens de espermatozoides eletronicamente digitalizados. Os parâmetros fornecidos por este equipamento são: motilidade total, motilidade progressiva, linearidade, retilinearidade e índice de oscilação, expressos em percentual; velocidade curvilinear, velocidade em linha reta e velocidade média do percurso; frequência de batimento flagelar cruzado; e amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (Verstegen et al., 2002).

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).

Em relação à análise da morfologia espermática, a introdução do sistema de análise da morfometria espermática automatizada (ASMA) tenta superar os problemas da subjetividade dos métodos de avaliação visual. O sistema ASMA determina o comprimento, a largura e a área da cabeça, e possibilita realizar associações destes dados, como largura/comprimento e perímetro. A análise da morfometria espermática proporciona estudar uma série de parâmetros objetivos que facilita a padronização da avaliação morfológica destes gametas (Marco-Jiménez et al., 2005).

2.6.1 Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal

A integridade das membranas e a estabilidade de seu aspecto semipermeável são pré-requisitos para a viabilidade do espermatozoide. Além disso, se a MP está intacta, mas funcionalmente instável, o espermatozoide não é capaz de interagir com o ambiente do trato genital feminino e, conseqüentemente, fertilizar o oócito (Rodriguez-Martinez, 2006). Gil et al. (1999) ao avaliarem espermatozoides criopreservados de ovinos, encontraram um maior percentual de células móveis em relação ao percentual de células com MP íntegra. Segundo os autores, o processo

de congelamento e descongelamento reduz a motilidade de forma sutil quando comparada com a integridade estrutural. Isso significa que algumas células móveis já podem apresentar danos de membranas celulares uma vez que as integridades das membranas plasmáticas e acrossomal são mais vulneráveis às crioinjúrias em relação ao aparelho locomotor da célula espermática (Correa e Zavos, 1996). Graham e Mocé (2005) definem integridade de MP como sinônimo de viabilidade espermática.

A capacitação seguida da reação acrossomal são requisitos fundamentais para que espermatozoides de mamíferos possam fecundar. Para isso, são necessárias uma MP e acrossoma intactos para que o espermatozoide se ligue à ZP (Kitiyanant et al., 2002).

Uma das propriedades da membrana celular é a habilidade de permitir o transporte seletivo de moléculas, principalmente àquelas com baixo peso molecular. A fim de se avaliar a função espermática pela integridade de MP, o teste hiposmótico é realizado rotineiramente, sendo este um teste simples, prático e confiável (Arruda et al., 2010).

Quando o espermatozoide é colocado em uma solução hiposmótica, a água o invade na tentativa de se alcançar o equilíbrio osmótico. O influxo de água irá aumentar o volume espermático e a MP provocando uma turgidez. O flagelo do espermatozoide, por apresentar uma membrana mais frágil do que a presente na região da cabeça, parece ser suscetível a estas condições de teste hiposmótico e se dobra. Esta condição indica que o transporte de água através da membrana ocorre normalmente e que esta se encontra íntegra e com funcionalidade (Jeyedran et al., 1984; Fuse et al., 1993).

Em muitas espécies, as soluções hiposmóticas ideais já foram definidas. Na espécie caprina, a solução hiposmótica ideal para análise de espermatozoides criopreservados foi formulada pela combinação de citrato de sódio (50%) e frutose (50%) (Fonseca et al., 2001). Para sêmen fresco este teste pode ser avaliado por intermédio de uma solução hiposmótica de 125 mOsm/l, cuja osmolaridade promove uma turgidez de membrana mais eficiente, levando a um dobramento de cauda mais evidente. Com isso, o teste hiposmótico se apresenta como uma análise viável,

prática e precisa para avaliação individual de rotina de machos caprinos (Fonseca et al., 2005).

A integridade de membrana é usualmente avaliada após a exposição dos espermatozoides a corantes impermeáveis à membrana, de maneira que os gametas não corados são considerados vivos. Atualmente muitos corantes usados são fluoróforos que reagem com enzimas citoplasmáticas ou ligam-se ao DNA (Silva e Gadella, 2006). Muitos estudos foram realizados inicialmente com avaliações de esfregaços secos de corante supravital, como eosina, conjugada ou não com nigrosina (Hancock, 1951) e posteriormente com azul tripan (Wilson et al., 1969).

Diferentes técnicas de coloração fluorescente têm sido desenvolvidas, o que torna possível a análise mais ampla da qualidade espermática em níveis ultra-estrutural, funcional e bioquímico (Silva e Gadella, 2006). Para isso, muitas sondas fluorescentes vêm sendo utilizadas isoladamente ou em combinação visando examinar a integridade de membranas espermáticas com o auxílio da microscopia fluorescente (Batista e Guerra, 2010).

Atualmente uma variedade muito grande de sondas fluorescentes tem sido usada isoladamente ou em associações em andrologia, pois a combinação de várias sondas fluorescentes possibilita a avaliação de diversos compartimentos espermáticos simultaneamente. Portanto, com o uso de sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência, ou citometria de fluxo, avalia-se a integridade de membranas plasmática e acrossomal, o potencial mitocondrial, a translocação de fosfolipídios de membrana, o índice de fragmentação de DNA, a integridade do flagelo, a lipoperoxidação, fosforilação da tirosina, reação acrossômica, entre outros (Arruda et al., 2003).

Várias sondas fluorescentes têm sido usadas para análise da integridade de membrana em espermatozoides de caprinos, como: diacetato de carboxifluoresceína em combinação com iodeto de propídio (IP) (Coletto et al., 2002); SYBR[®]14 em combinação com IP (Peterson et al., 2007) e Hoechst 33258 (Marco-Jiménez et al., 2006).

A reação acrossomal é um pré-requisito para a penetração do espermatozoide no oócito e por isso a importância da sua avaliação. A integridade acrossomal pode ser mensurada também pelo uso de sondas fluorescentes. Os métodos de avaliação acrossomal mais utilizados se dão por meio do uso de sondas fluorescentes conjugadas a lecitinas, tais como isotiocianato de fluoresceínas associadas a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA) ou *Pisum sativum* agglutinin (FITC-PSA) (Herrera et al., 2002). Estas lecitinas ligam-se especificamente a conteúdos acrossomais por meio da interação com glicoconjugados da membrana acrossomal externa (FITC-PNA) ou com grupos sacarídeos da glicoproteína pró-acrosina (FITC-PSA) (Silva e Gadella, 2006).

Didion et al. (1989), sugere que a técnica de coloração supravital dupla utilizando azul tripan e Giemsa (ATG) é um procedimento simples para detecção da integridade de membranas plasmática e acrossomal, podendo observar a ocorrência da reação acrossomal. Essa coloração consiste na utilização dos corantes azul tripan, para diferenciar espermatozoides com MP lesada e intacta e Giemsa, para detectar acrossoma intacto e lesado.

A primeira descrição do uso do ATG para avaliar simultaneamente as integridades de membranas plasmática e acrossomal foi feita por Didion et al. (1989). Desde então, tem sido usado por ser uma técnica acessível, simples, eficiente e de baixo custo (Kitiyant et al., 2002), podendo ser empregado para estimar o potencial fecundante de amostras de sêmen destinadas à fecundação *in vitro* ou à inseminação artificial (Tartaglione e Ritta, 2004).

O azul tripan é um corante vital que detecta espermatozoides com MP lesada. Quando a membrana espermática encontra-se lesada, o corante entra livremente por ela, corando a célula espermática em azul. Por outro lado, uma vez íntegra, a membrana permanece intransponível impedindo a entrada do corante, nesse caso, o espermatozoide íntegro não se cora (Talbot e Chacon, 1981) O corante Giemsa indica o estado acrossomal. Ao apresentar acrossoma intacto ou não reagido, essa estrutura é impregnada pelo Giemsa, corando-se em roxo ou rosa escuro (Tartaglione e Ritta, 2004). No caso da ocorrência da reação acrossomal ou lesão da membrana acrossomal, o acrossoma não é capaz de reter o corante e este não se cora pelo Giemsa.

Quando os espermatozoides são corados com ATG, quatro categorias são consideradas: a) espermatozoide com membranas plasmáticas e acrossomal

intactas; b) membranas plasmática e acrossomal lesadas; c) MP intacta e acrossoma lesado; e d) MP lesada e acrossoma intacto. Quando o acrossoma se encontra intacto, esta estrutura em espermatozoides com MP lesada é corado mais intensamente que o acrossoma de espermatozoides com MP intacta. Da mesma forma, quando o acrossoma se encontra lesado, os espermatozoides com MP lesada também apresentam esta área mais corada do que a mesma área nas células apresentando MP intacta (Didion et al., 1989).

A técnica possui várias vantagens, pois os esfregaços são observados em microscópio de campo claro, podem ser lidos em momento conveniente, fixados com rápida secagem sob coluna de ar quente, e as lavagens não influenciam a condição acrossomal. Uma desvantagem é que não diferencia espermatozoide morto, o qual perdeu o acrossoma após a morte celular, de espermatozoide que sofreu a reação acrossomal verdadeira e morreu antes da fixação, sendo impossível a diferenciação da reação acrossomal verdadeira e falsa (Didion et al., 1989).

Didion et al. (1989) observaram que a motilidade espermática foi semelhante à porcentagem de espermatozoides com MP intacta, não corados com azul tripan, e a associação com o Giemsa não modificou sua habilidade de diferenciar vivos e mortos. Além disso, os resultados da coloração dupla ATG foram iguais ao exame em contraste diferencial de interferência na avaliação da ocorrência da reação acrossomal, confirmando a validade da técnica. Suttiyotin e Thwaites (1991), avaliando sêmen fresco de ovino, observaram correlação significativa entre a porcentagem conhecida de espermatozoides mortos e células coradas com azul tripan.

Perez et al. (1996) observaram que um problema comum durante a avaliação de espermatozoides criopreservados por colorações supravitais, é o grande número de células consideradas mortas. A técnica de coloração pode superestimar a população de células mortas, classificando-as como tal quando as mesmas apresentam algum dano de MP, o que permite a impregnação do corante.

Tartaglione e Ritta (2004) trabalharam com o ATG para avaliar a condição acrossomal de espermatozoides criopreservados de touros e observaram que este apresentou alta correlação com a fertilidade, portanto, sendo considerado apto em prever a fertilidade *in vitro*.

Fernandes et al. (2008), avaliando as características seminais de touros Nelore submetidos à insulação escrotal e respectivo desempenho na fecundação *in*

vitro, verificaram que a variável acrossoma intacto, analisada pelo ATG, explicou as variações nas taxas de clivagem e de blastocisto.

Martins et al. (2007) avaliaram a fertilidade *in vitro* de espermatozoides epididimários criopreservados, obtidos de três touros post-mortem. Os autores correlacionaram a integridade do acrossoma com as taxas de clivagem e blastocisto, obtidas nos dias dois e sete, respectivamente, do cultivo *in vitro*. Estes autores concluíram que os touros A1 e A2, com 66 e 68% de acrossomas intactos, respectivamente, tiveram taxas semelhantes de blastocisto (33 e 54%), enquanto o touro A3, com 60% de espermatozoides com acrossoma intacto, apresentou uma taxa menor (21,48%).

Carvalho et al. (2008) identificaram maior porcentagem de espermatozoides com MP intacta e acrossoma intacto pelo uso da coloração dupla ATG, em relação à técnica de coloração com FITC-PNA.

2.7 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES NA ESPÉCIE CAPRINA

Os caprinos são uma espécie de elevada importância econômica pela sua contribuição na produção de carne, leite e pele em diversos países (Paula et al., 2008). Existem aproximadamente 700 milhões de caprinos distribuídos mundialmente (FAO, 2003), destes, cerca de 10,4 milhões compõem o rebanho nacional, e, deste total, 92,4% são explorados na região Nordeste brasileira (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2006).

Dentro dessa perspectiva, há uma necessidade da aplicação de técnicas de reprodução assistida com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva e produtiva do rebanho para que possa haver um aproveitamento mais eficiente dos genótipos utilizados (Carneiro, 2007).

Os métodos de PIVE envolvem as etapas de colheita de oócitos, maturação de oócitos primários provenientes de folículos antrais, fertilização de oócitos maduros com espermatozoides capacitados e cultivo de embriões *in vitro* por até uma semana atingindo o estágio de blastocisto para posterior transferência para receptoras sincronizadas ou criopreservação para uso posterior (Carneiro, 2007).

Nesta tecnologia, os ovários podem ser obtidos de abatedouros e são fonte economicamente viável e abundante de oócitos. Já a recuperação oocitária *in vivo* é conseguida através de laparotomia ou pela técnica de laparoscopia guiada por ultrassom (Tervit, 1996). Ao contrário da espécie bovina, em que a punção folicular por laparoscopia é praticada rotineiramente, poucas equipes no mundo utilizam esse método em caprinos (Paula et al., 2008).

A colheita de oócitos de ovários provenientes de abatedouro é bastante apropriada para pesquisas científicas, porém é inadequada para a utilização em animais de elevado valor genético devido ao desconhecimento das condições sanitárias dos animais utilizados que pode ter como consequência o aumento da incidência de diversas doenças no rebanho receptor dos embriões produzidos a partir dessa fonte de oócitos (Cognié et al., 2004).

Baldassarre et al. (2002) demonstraram que a recuperação oocitária, após a laparoscopia em cabras, apresentou bons resultados, obtendo de 4 a 6 oócitos por doadora. Progresso considerável tem sido adquirido em produção de embriões de animais jovens (5-9 semanas) após recuperação de um número considerável de oócitos (Baldassare et al., 2002). Utilizando protocolos específicos, que não apresentam a necessidade de sincronizar os ciclos estrais com progestágenos, cabras pré-púberes são capazes de produzir, em média, quase duas vezes mais oócitos por sessão de colheita laparoscópica do que cabras adultas (Koeman et al., 2003).

Apesar dos resultados positivos, há diferenças de produção de blastocistos quando comparados com oócitos aspirados de animal adulto com animais pré-púberes (19% vs. 65% - Baldassare et al., 2002) sugerindo que oócitos provenientes de animais pré-púberes não possuem um potencial de desenvolvimento como dos animais adultos, havendo ainda altos índices de polispermia como possível consequência da dispersão dos grânulos corticais. Maiores estudos são necessários nessa área para propiciar produção de embriões provenientes de animais pré-púberes com um potencial de redução do intervalo de gerações (Carneiro, 2007).

Repetidas colheitas laparoscópicas de oócitos seguidas de fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo dos zigotos até o estágio de blastocisto possibilitam a obtenção de um

grande número de embriões e conseqüente aumento na progênie de fêmeas de elite, quando comparado à produção de embriões *in vivo*. Essas técnicas permitem produzir, em tempo relativamente curto, mais embriões a partir de uma mesma fêmea (Cognié e Baril, 2002).

Outra possibilidade de fonte oocitária de caprinos é a punção *in vivo* de folículos, por meio de uma agulha acoplada a uma bomba de vácuo, guiada por ultrassonografia transvaginal (Graff et al., 1999). Pelo uso desse método, Graff et al. (1999) obtiveram entre 60 e 78% da taxa de colheita oocitária. No entanto, esse método ainda é pouco utilizado em caprinos e vem sendo alvo de estudos para seu aprimoramento e futura utilização em larga escala (Paula et al., 2008).

A punção folicular é menos invasiva e mais simples que a colheita de embriões dos cornos uterinos, pode ser repetida em um número maior de vezes sem a necessidade de um tratamento hormonal e é eficiente em diferentes estádios fisiológicos (pré-puberdade ou início da gestação) em que a produção *in vivo* de embriões é impossível (Besenfelder et al., 1999). Em especial na espécie caprina, essa abordagem permite a eliminação do problema da regressão prematura dos corpos lúteos encontrada em uma porcentagem elevada das fêmeas superovuladas (Cognié e Baril, 2002).

A maturação oocitária permanece ainda como o principal entrave para PIVE, no entanto, o desenvolvimento de novas metodologias que promovam adequadas maturações citoplasmática e nuclear é de fundamental importância para o sucesso da PIVE em caprinos (Cognié et al., 2004).

2.7.1 Seleção espermática

A introdução da reprodução assistida, especialmente a PIVE, implicou no desenvolvimento de diferentes métodos de preparação e seleção espermática (Henkel e Schill, 2003). Durante o transporte espermático no trato genital feminino, os gametas masculinos atravessam barreiras naturais, que selecionam aqueles aptos à fecundação do oócito e, da mesma forma, na PIVE, também são necessários métodos que mimetizem esse processo (Somfai et al., 2002). Para

realização desta biotécnica, células criopreservadas são requeridas, reforçando a necessidade de uma seleção rigorosa dos espermatozoides (Zúccari et al., 2008).

A preparação espermática para a PIVE envolve alguns processos iniciais de seleção dos espermatozoides de melhor qualidade e separação do plasma seminal, dos diluidores e dos crioprotetores. Esta separação é necessária a fim de permitir a separação dos espermatozoides vivos dos mortos, evitando os efeitos deletérios que estes possam exercer sobre os espermatozoides cuja viabilidade permaneceu preservada (Parrish et al., 1995).

A técnica de seleção espermática ideal deve ser: rápida, simples, barata, isolar o máximo de células móveis, não causar danos aos espermatozoides, não alterar a fisiologia da célula, eliminar espermatozoides mortos, assim como outras células incluindo leucócitos e microrganismos; eliminar substâncias tóxicas, como as espécies reativas de oxigênio e permitir o processamento de grandes volumes de ejaculado (Drobnis et al., 1991).

O processo de criopreservação gera uma série de danos físicos e oxidativos à célula espermática, desta forma, espermatozoides criopreservados apresentam motilidade e qualidade inferiores quando comparado ao espermatozoides provenientes de amostras frescas. Além disso, a concentração de espermatozoides móveis é diminuída pela adição de diluidores adicionados na técnica de criopreservação (Drobnis et al., 1991). Devido à queda de viabilidade dos espermatozoides criopreservados, existe a necessidade da sua seleção e recuperação de células cuja motilidade e função espermática foram preservadas (Drobnis et al., 1991; Parrish et al., 1995).

A seleção por gradiente de densidade Percoll, o método de migração ascendente de espermatozoides pelo “Swim-up” e a lavagem espermática mediante centrifugação ou “wash”, são as técnicas mais utilizadas para seleção de espermatozoides viáveis (Parrish et al., 1995).

O método do “Swim-up” baseia-se na tendência inata que os espermatozoides de maior motilidade possuem de migrarem para cima após incubação em um meio apropriado (Shamsuddin e Rodriguez-Martinez, 1994). Após a incubação, os espermatozoides mais móveis podem ser recolhidos na fração superior do meio, enquanto que os pouco móveis ou mortos permanecem na fração inferior (Parrish et al., 1988).

Durante a migração ascendente dos espermatozoides através do meio, ocorre a remoção dos fatores de decapacitação, diluentes e crioprotetores. Os autores que utilizam o “Swim-up” alegam que, embora a concentração de espermatozoides obtida com este método seja baixa (10-20% das amostras originais), têm sido observada taxa de clivagem, após a FIV, significativamente mais alta do que outros métodos, o que compensa a menor concentração de espermatozoides obtida (Shamsuddin e Rodriguez-Martinez, 1994; Parrish et al., 1995).

Segundo Parrish e Foote (1987), o número de espermatozoides recuperados após a realização da técnica de “Swim-up” apresenta uma alta correlação com a quantidade de células viáveis presentes em uma amostra seminal. Nesse sentido, Zhang et al. (1999), encontraram uma relação significativa entre os espermatozoides separados por “Swim-up” com os resultados do teste de ligação a ZP e com a taxa de formação de blastocistos na FIV. Outros autores também confirmam a correlação positiva entre número de espermatozoides recuperados na técnica de “Swim-up” e os índices de fertilidade *in vivo* (Liu e Baker, 1992; Parrish et al., 1995; Andersen e Grinstead, 1997; Rodriguez-Martínez, 2003; Mehmooch et al., 2009).

A técnica de migração ascendente possui as seguintes vantagens: recuperar amostras límpidas e com espermatozoides com alta motilidade (maior que 90%); apresenta células espermáticas morfolologicamente normais; ausência de outras células e debris celulares; ser simples e de fácil execução; e ser barata (Henkel e Schill, 2003). Por outro lado é uma técnica que deve ser aplicada principalmente em ejaculados concentrados, uma vez que a recuperação espermática é baixa (Tea et al., 1984).

A técnica de “Swim-up” tem como principal desvantagem apresentar baixa taxa de recuperação, além de provocar lesões maciças pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), levando a uma redução significativa do percentual de espermatozoides com condensação normal da cromatina (Henkel e Schill, 2003).

Evenson e Jost (2000), em estudo com humanos, touros, garanhões e cachalôs, relataram que, quando os espermatozoides são submetidos à técnica de “Swim-up”, há um aumento da percentagem de células móveis e remoção das mortas.

Shamsuddin e Rodriguez-Martinez (1994) testaram a técnica de “Swim-up” em sêmen congelado de bovino e observaram que para touros com alta motilidade após o descongelamento (83%), houve redução deste parâmetro (77%) após a seleção. Em touros de menor motilidade (56%), não houve diferença na motilidade (75%) após a técnica. Em relação à viabilidade espermática, houve aumento do percentual de células íntegras (62%) para animais que apresentaram baixa viabilidade após o descongelamento (32%). Enquanto que para touros que apresentaram alta viabilidade (56%) não houve diferença (73%). Quanto à fertilidade *in vitro*, os autores observaram 68% e 51% de penetração em oócitos para touros de alta e baixa motilidade, respectivamente.

O método de seleção por “Swim-up” é uma técnica amplamente utilizada principalmente nas espécies bovina e humana (Ng et al., 1992; Parrish et al., 1995; Somfai et al., 2002). No entanto, esta técnica ainda apresenta alguns entraves à obtenção de melhores resultados na espécie caprina, em decorrência da falta de estudos e pesquisas nessa área envolvendo esta espécie.

O método de recuperação espermática pela técnica de Percoll consiste na separação dos espermatozoides em gradientes descontínuos de densidade. Estes gradientes são compostos de soluções isotônicas feitas a partir de substâncias de partículas coloidais (partículas de sílica coloidal com 15 a 30 nm de diâmetro, recobertas com polivinil pirrolidona (PVP) não-dialisável) que permitem, em uma única centrifugação, separar os espermatozoides viáveis de demais partículas (Mortimer, 1994).

Devido à grande variação no tamanho das partículas, quando devidamente centrifugado, o Percoll forma um gradiente de densidade pela organização de suas partículas que passam a apresentar um aumento gradual da densidade da fração superior do meio à fração inferior. Durante a técnica, todas as células atingem o fundo do tubo contendo o meio de cultura, contudo, os espermatozoides mais móveis se movem ativamente em direção ao fundo e são capazes de penetrar as camadas de partículas coloidais mais rapidamente do que as células menos móveis e imóveis. Com isso, as células mais móveis chegam mais rapidamente ao fundo, enriquecendo o “pellet” formado (Henkel e Schill, 2003).

Estudos encontrados na literatura, preconizam volumes de 2 mL por gradiente de Percoll utilizado e uma centrifugação a 400 x g, por um período de até 30

minutos. No entanto, na busca de uma máxima recuperação de espermatozoides de boa qualidade, o método de seleção por gradientes de Percoll sofreu diversas modificações ao longo dos anos. Os protocolos tradicionais foram substituídos pelos métodos de mini-Percoll que empregam gradientes de 90 e 45% em volumes reduzidos a altas forças de centrifugação (Folchini et al., 2002).

De acordo com Parrish et al. (1995), o método do gradiente de Percoll resulta em uma recuperação de espermatozoides móveis seis vezes maior do que o “Swim-up”. Por outro lado, os espermatozoides preparados pelo método do “Swim-up” penetram um maior número de oócitos, ou seja, este método resulta em taxas de fecundação e de clivagem maiores durante a PIVE ao ser comparado com o Percoll, quando a mesma concentração de espermatozoides é utilizada.

Somfai et al. (2002), verificaram que as técnicas de “Swim-up” e Percoll aumentaram significativamente a proporção de células com MP intacta em sêmen congelado de touros, avaliadas pelo ATG, porém obtiveram maior taxa de recuperação espermática e maior percentual de células com MP e acrossoma íntegros após a técnica de Percoll.

Em ovinos, a passagem de espermatozoides criopreservados pelo Percoll aumentou a porcentagem de móveis (Valcárcel et al., 1997). Segundo Centola et al. (1998) e Chen e Bongso (1999), não houve diferença entre as avaliações de motilidade pré e pós Percoll em sêmen fresco de humanos.

Palomo et al. (1999) não encontraram diferença entre o método de “Swim-up” e Percoll em relação aos parâmetros de motilidade, integridade acrossomal e de MP, em sêmen fresco de caprino. Contudo, os autores observaram um aumento significativo na viabilidade espermática no método de “Swim-up” (81,5%) quando comparado com o Percoll (69,1%) e com os valores iniciais (74,5%). Não houve diferença entre os tratamentos para a porcentagem de penetração de oócitos.

Mehmood et al. (2009), concluíram que a seleção espermática pela técnica de “Swim-up” é o método mais viável para a PIVE de búfalos. Os autores observaram que a seleção de espermatozoides bubalinos descongelados pelo método de “Swim-up” apresentou maior motilidade quando comparada ao método de Percoll (69,1% vs. 63,1%), enquanto que a taxa de recuperação espermática foi maior no método de Percoll (6% vs. 4,1%). A integridade de MP foi significativamente maior no “Swim-up” (77,3% vs. 70,5%). Além disso, o método de “Swim-up” também apresentou

maior taxa de clivagem, e este parâmetro variou entre os animais, por outro lado, não houve diferença individual no método de Percoll.

Segundo Parrish et al. (1995), o método de Percoll é a técnica mais indicada para seleção espermática de rotina para sêmen descongelado de touros. O método de “Swim-up” deve ser somente utilizado quando os espermatozoides apresentarem baixas taxas de penetração no oócito após o método de Percoll. Neste estudo, a técnica de “Swim-up” apresentou uma taxa de recuperação espermática de 9%, enquanto no Percoll foi obtida uma taxa de 40%. A taxa de penetração de oócitos foi de 74% e 52% para “Swim-up” e Percoll, respectivamente, tendo o método de “Swim-up” atingido uma maior taxa de clivagem. Em dois dos três animais avaliados no estudo, houve melhora na taxa de penetração de oócitos após a técnica de Percoll, quando a concentração espermática foi aumentada.

Estudos sobre os danos que o Percoll pode trazer às células espermáticas ainda são controversos. Desde 1999, o uso do Percoll foi proibido na reprodução assistida de humanos, devido aos danos causados pelas moléculas de PVP que o compõem (Rho et al., 2001). Strehler et al. (1998) reportaram que essas moléculas apresentam um efeito adverso nas membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides. Andersen e Grinsted (1997), afirmaram que a sílica, componente do gradiente de densidade, apresenta a tendência de precipitar junto aos espermatozoides, podendo causar danos estruturais. Entretanto, para Palomo et al. (1999), apesar da técnica de Percoll não melhorar os parâmetros após o descongelamento, não são descritas evidências de que promova efeitos negativos sobre os espermatozoides.

O método de seleção espermática de lavagem por centrifugação consiste na lavagem dos espermatozoides utilizando solução salina tamponada (PBS - Phosphate Buffered Saline) e é uma das formas utilizadas para uniformizar variações de volume e concentração, assim como manter estes parâmetros constantes, sem que se observe influência negativa sobre as células espermáticas. Diversas forças e tempos de centrifugação não apresentam efeito negativo sobre a motilidade espermática, nem sobre a sobrevivência dos espermatozoides. Além disso, observa-se efeitos positivos sobre a motilidade espermática (Lopes e Papa, 1998).

O contínuo metabolismo espermático produz grandes quantidades de catabólitos tóxicos, acarretando num aumento do ácido láctico extracelular. Este acúmulo pode causar a morte dos espermatozoides devido a drásticas alterações de pH. Daí a necessidade da adição de soluções tampão para a lavagem espermática (Holt, 2000).

A lavagem dos espermatozoides remove fatores inibidores da capacitação e prostaglandinas, sendo a técnica mais comumente utilizada no preparo dos espermatozoides humanos para inseminação artificial (Carrell et al., 1998).

Stojanov et al. (1994), selecionando espermatozoides de carneiros, observaram uma taxa maior de penetração de oócitos após a técnica de Percoll quando comparada a lavagem.

Palomo et al. (1999), observaram que as porcentagens de motilidade (79%), integridade de membrana (77,5%) e integridade de acrossoma (91,4%) obtidas após a seleção espermática por “Swim-up” em caprinos, foi significativamente maior do que os parâmetros pós descongelamento (60, 63 e 87%, respectivamente). Esses resultados também foram maiores do que os resultados obtidos após a técnica de lavagem por centrifugação. Não houve diferença em relação à integridade acrossomal entre os tratamentos.

Alguns estudos indicam que as técnicas de seleção espermática em gradiente de Percoll e lavagem por centrifugação, em geral, são mais eficazes na recuperação de células móveis, em especial, para o sêmen de touros de baixa fertilidade na PIVE, quando comparados àqueles de alta fertilidade (Tanghe et al., 2002; Suzuki et al., 2003).

Para Centola et al. (1998), as técnicas que empregam unicamente lavagens e centrifugações como mecanismo básico de preparação espermática podem resultar, direta ou indiretamente, em danos irreversíveis aos espermatozoides, havendo, portanto, a preferência por métodos baseados na própria capacidade de migração espermática para efeito de avaliação da qualidade das amostras seminais. Aitken e Clarkson (1988), utilizando espermatozoides humanos, constataram que ocorre um aumento de ERO entre 1 e 7 minutos de centrifugação.

Dode et al. (2002) afirmam que mesmo que os espermatozoides não tenham sido selecionados, como na lavagem por centrifugação, um número suficiente de células capazes para fertilizar estão presentes. Os autores avaliaram o efeito de

diferentes métodos de seleção espermática na taxa de penetração e clivagem em bovinos e verificaram que não houve diferença ($P < 0,05$) para a taxa de penetração entre os métodos de “Swim-up”, Percoll e lavagem ($70,3 \pm 6,8\%$, $60,8 \pm 6,7\%$ e $53,8 \pm 6,8\%$, respectivamente), assim como para a taxa de clivagem, cujos valores entre os tratamentos foram semelhantes ($56,7 \pm 7,2\%$, $51,5 \pm 7,3\%$ e $47 \pm 6,5\%$, respectivamente) Os autores concluíram que é possível que a concentração espermática utilizada para a FIV possa superar as diferenças na qualidade dos espermatozoides obtidos através dos diferentes métodos de seleção espermática testados no estudo e que todos podem ser utilizados com nenhum efeito prejudicial sobre a fertilização.

Khalifa e El-Saidy (2006) concluíram que a preparação espermática para a FIV de bovinos pôde ser simplificada pelo método de lavagem por centrifugação, a fim de evitar os danos causados pelo efeito de diluição do “Swim-up” e pela toxicidade do meio de gradiente de Percoll. Os autores afirmaram que o método de lavagem apresenta uma série de vantagens como o fato de ser rápido, simples de se executar, barato e recuperar um número suficiente de espermatozoides viáveis.

2.7.2 Agentes indutores da capacitação *in vitro*

Como dito anteriormente, os espermatozoides de mamíferos não possuem habilidade para fecundar os oócitos imediatamente após a ejaculação, mesmo estando móveis e com morfologia normal. No processo *in vivo*, os espermatozoides alcançam esta capacidade fecundante por alterações estruturais da MP durante o trânsito no trato genital feminino. Para que ocorra estas alterações de membrana *in vitro*, há a necessidade de se adicionar agentes capacitores a fim de induzir essa reação (Yang et al., 1993).

Alguns glicosaminoglicanos presentes no trato genital feminino são responsabilizados por induzirem a capacitação espermática *in vivo*. Nos processos *in vitro*, o glicosaminoglicano mais utilizado para induzir essa reação é a heparina (Gonçalves et al., 2001).

Os mecanismos da indução da capacitação pela heparina envolvem ligações reversíveis e exotérmicas com os espermatozoides, alterações das proteínas da MP e dos sítios de ligação de proteínas, como as lecitinas, por ativação dos canais

iônicos para elevação de cálcio, pH e AMPc, além de acelerar a conversão da proacrosina em acrosina (Yanagimachi, 1994; Thérien et al., 1998). Além disso, a heparina é capaz de causar alterações na MP do espermatozoide removendo principalmente as proteínas provenientes do plasma seminal e da superfície da membrana, as quais são consideradas inibidoras da capacitação (Parrish et al, 1988).

Malik et al. (1997) induziram a capacitação espermática incubando espermatozoides de caprinos por 45 minutos em um meio de cultura contendo 10 µL/mL de heparina. Após a coloração de ATG, os autores observaram que a porcentagem de espermatozoides capacitados foi abaixo de 8%, sugerindo que o tempo de incubação foi insuficiente ou a concentração de heparina utilizada foi baixa.

Pereira et al. (2000) testaram a influência da heparina e do cálcio ionóforo sobre a capacitação espermática de bodes. Os autores observaram que os espermatozoides tratados pela heparina apresentaram motilidade maior quando comparada com a motilidade adquirida pelo cálcio ionóforo nos intervalos de 1, 15 e 30 minutos, (61,3; 60,0; 66,3% e 57,5; 57,5; 56,2%, respectivamente). Contudo a porcentagem de espermatozoides capacitados pelo cálcio foi superior ao da heparina, nos diferentes intervalos (3,5; 19; 23,5% e 4,8; 6; 6,5%, respectivamente).

Zhou et al. (2004) testaram diferentes métodos de indução à capacitação, utilizando diferentes concentrações de heparina, tempo e temperatura de incubação. Quando os espermatozoides foram capacitados com 5, 10, 25, 50 e 100 mg/mL de heparina por 45 minutos, as concentrações de 50 e 100mg/mL apresentaram os melhores índices de capacitação (55% e 56%, respectivamente). A porcentagem de capacitação aumentou com o aumento do intervalo de exposição à heparina (0, 10, 20, 30, 45, 60 e 120 minutos), porém não houve diferença entre os intervalos de 45 a 120 minutos quanto à motilidade espermática. A integridade de membrana diminuiu significativamente no intervalo de 120 horas. Além destes tratamentos, os autores testaram duas temperaturas durante a incubação, e observaram que as porcentagens de capacitação espermática foram maiores nas temperaturas de 42° e 38,5°C do que 15° e 37°C. Porém, na temperatura de 42°C houve queda significativa da motilidade e integridade acrossomal.

O organismo produz naturalmente radicais livres e outras ERO decorrente do próprio metabolismo, como subprodutos da respiração e da síntese de estruturas mais complexas. Quando há altas concentrações de ERO, os espermatozoides sofrem alterações que estão associadas com a obtenção da habilidade de fertilização, aumentando a taxa de hiperativação e capacitação (De Lamirande et al., 1997a). No momento da ovulação, ocorre aumento na concentração dessas substâncias, enfatizando a relevância fisiológica no processo de capacitação proveniente do ERO (Maas et al., 1976).

Em circunstâncias normais, o oxigênio é, então, convertido em água, e a energia é estocada e usada para a produção de ATP. Porém, durante esse processo, uma pequena porcentagem do oxigênio consumido pela mitocôndria é convertida em uma das várias ERO, em vez de água. Portanto, paradoxalmente, um processo fundamental para o desenvolvimento da vida dos eucariotos (fosforilação oxidativa) é também um dos principais responsáveis pela produção de ERO (Downling e Simmons, 2009).

Quando as ERO atacam as duplas ligações associadas aos ácidos graxos insaturados, uma reação em cadeia de peroxidação lipídica é iniciada, a qual, não sendo paralisada, leva a uma perda da permeabilidade da membrana e conseqüentemente da função espermática (Aitken e Krausz, 2001).

As ERO incluem todos os radicais (íon hidroxil, superóxido, óxido nítrico, peróxido, etc.) e não radicais (ozônio, oxigênio, peroxidases lipídicas, peróxido de hidrogênio) derivados do oxigênio, os quais são eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons (Agarwal et al., 2005).

A produção excessiva de ERO no sêmen leva à disfunção espermática e à diminuição da capacidade de fertilização. Aitken e Clarkson (1988) constataram que a geração de ERO foi encontrada como uma propriedade de células menos móveis e de pior qualidade provenientes da fração inferior do meio de cultura durante o processo de “Swim-up” e daquelas que ficam retidas nas colunas de menor densidade do gradiente de Percoll. Esses radicais livres são rapidamente desprendidos da célula espermática e podem trazer danos também aos

espermatozoides saudáveis que se encontram ao redor. No entanto, quando em baixas concentrações, essas ERO exercem um papel-chave na regulação da competência funcional da célula espermática, uma vez que o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio estão envolvidos no mecanismo de capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão espermatozóide-oócito em várias espécies (Maia e Bicudo, 2009).

Aitken e Clarkson (1988), a fim de determinar os danos causados pela geração de ERO na funcionalidade espermática em humanos, observaram que o processo de centrifugação aumenta em torno de 34 vezes a produção dessas substâncias quando comparado a uma amostra seminal que não passou por tal procedimento. Os autores concluíram que a centrifugação deve ser feita após a seleção das células de melhor qualidade, a fim de minimizar os danos oferecidos pela presença das células de baixa qualidade durante o processo de centrifugação.

A possível explicação para o estresse oxidativo nos espermatozoides baseia-se no fato de que, em mamíferos, as membranas espermáticas são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, o que as torna muito fluidas e, ao mesmo tempo, muito susceptíveis a danos peroxidativos induzidos por ERO, determinando perda de suas funções (De Lamirande e Gagnon, 1995).

O óxido nítrico (ON) é um ERO de meia vida curta, originado a partir do L-arginina, em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Essas enzimas são encontradas em vários tipos celulares, incluindo o trato genital masculino e feminino (De Lamirande et al., 1997a). Paes de Carvalho et al. (2003) demonstraram, pela primeira vez em bovinos, que o ON induz à capacitação *in vitro* de espermatozoides criopreservados, porém sua ação é menos efetiva do que a da heparina. Além disso, durante a capacitação induzida pela heparina, espermatozoides sintetizam ON (Leal et al., 2009).

Nos meios utilizados para a pesquisa da função espermática *in vitro* utiliza-se o nitroprussiato de sódio (NPS) como principal substância doadora de ON, uma vez que este possui uma vida média muito curta e pode ser facilmente degradável. O NPS funciona como uma fonte mais estável de fornecimento de ON ao meio, aumentando drasticamente os níveis de ON intracelular (Herrero et al., 1999).

Moran et al. (2008), demonstraram que o efeito do ON em induzir a capacitação espermática em suínos, foi constatada após incubação espermática por 1 hora a 38° C, na presença de NPS.

Herrero et al. (1994) demonstraram que ON estimula a hiperativação em espermatozoides de hamster. Outros estudos demonstraram que pequenas concentrações de NPS aumentam a motilidade espermática (Yeoman et al., 1998). Outros autores implicam a redução da motilidade espermática dependendo de diferentes concentrações de NPS (Tomlinson et al., 1992; Herrero et al., 1994; Roselli et al., 1995).

A importância do ON na capacitação espermática também está relacionada com a fosforilação de duas proteínas espermáticas (p81 e p105). Quando a capacitação é acelerada pela liberação de ON, há um aumento na fosforilação da tirosina dessas duas proteínas (Herrero et al., 1999). Por isso a fosforilação dessas duas proteínas parecem estar submetidas ao controle de ON. O interessante é que essas proteínas são moduladas também pelo superóxido e pelo peróxido de hidrogênio (Leclerc et al., 1997). O fato da fosforilação de ao menos duas proteínas espermáticas serem reguladas por três diferentes ERO enfatiza que o evento de capacitação trata-se de um processo oxidativo (Hererro e Gagnon, 2001).

O tipo e extensão das alterações causadas pelo ON dependem da sua concentração e do intervalo de tempo que os espermatozoides são expostos. Baixas concentrações dessa substância estão diretamente associadas às funções espermáticas, aumentando a motilidade e a viabilidade espermática. Por outro lado, altas concentrações de ON causam danos à célula espermática (Hererro e Gagnon, 2001).

Existem evidências de que pequenas quantidades de ERO são necessárias para que ocorra capacitação espermática, hiperativação da motilidade, reação acrossomal e fusão dos gametas no humano (De Lamirande e Gagnon, 1995), bovino (O'Flaherty et al., 2003) e equino (Baumber et al., 2003).

Rodriguez et al. (2005), não observaram efeito do NPS sobre o vigor e a motilidade espermática de bovinos. Os valores de capacitação obtidos com o uso de 0,05 µM NPS (31%) foram parecidos com aqueles encontrados pela capacitação

utilizando heparina (33%). Além disso, quando inibidores da NOS foram adicionados, houve diminuição da porcentagem de capacitação, de acordo com a dose aplicada.

Boccia et al. (2007), concluíram que o efeito do NPS indica indiretamente que o ON atua como um indutor de capacitação em espermatozoides de búfalos. Os autores observaram que após 1 hora de incubação com a heparina e NPS, a proporção de acrossoma reagido foi semelhante (35,3% e 28,5%, respectivamente). Estendendo a incubação para 2 horas, o NPS aumentou significativamente a reação acrossomal quando comparado com a heparina (60,1% e 44,1%, respectivamente). E quando foi prolongado para 3 horas de incubação, NPS aumentou ainda mais o percentual de acrossoma reagido (68,8% e 36,6%, respectivamente).

Villegas et al. (2003) e De Lamirande e Lamonthe (2009) relataram que os ERO também estão envolvidos na capacitação do espermatozoide humano. De Lamirande e Lamonthe (2009) observaram que há uma diferença entre as ERO formadas durante esse processo quanto ao período de tempo em que elas são necessárias. O superóxido é mais importante para os primeiros 30 minutos, e o ON é requerido no intervalo superior a duas horas.

O'Flaherty et al. (2003) avaliaram o envolvimento das ERO na capacitação do espermatozoide bovino ao induzir a capacitação com heparina. Os autores observaram que os níveis de ERO foram significativamente maiores nos espermatozoides capacitados submetidos à heparina, quando comparado ao grupo controle.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense sob o projeto de número 159 (Anexo A).

3.1 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES

O experimento foi realizado nas instalações do Laboratório de Reprodução Animal pertencente à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, localizada na cidade de Niterói, Rio de Janeiro, no período de dezembro de 2011 a novembro de 2012.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizadas doses comerciais de espermatozoides criopreservados de nove bodes da raça Saanen, com idade entre dois e cinco anos. Todas as análises foram realizadas em triplicata utilizando amostras espermáticas da mesma partida.

3.3 ENSAIO I – SELEÇÃO ESPERMÁTICA

3.3.1 Descongelamento dos espermatozoides

Foram utilizadas palhetas finas tipo francesa (0,25 mL) em todos os grupos durante todas as etapas do experimento. Cada palheta foi descongelada com o auxílio do descongelador eletrônico de sêmen (Descongelador digital programável 600 – TK Equipamentos para reprodução – Uberaba, MG - Brasil), a 38°C por 30 segundos. Após o descongelamento, a amostra espermática foi despejada em um microtubo aquecido onde foi devidamente homogeneizada.

3.3.2 Grupos experimentais

Após o descongelamento e devida homogeneização, cada dose foi destinada para a avaliação de um método de seleção espermática, constituindo assim um

grupo experimental, formando os seguintes grupos: lavagem de espermatozoides por centrifugação, gradiente de densidade Percoll e “Swim-up”.

Paralelamente aos tratamentos de seleção espermática e após o descongelamento, uma dose de espermatozoides foi submetida a lavagens consecutivas para retirada de crioprotetores e outras partículas indesejadas. A amostra foi submetida a três lavagens com 2 mL de meio de cultura Talp HEPES (Anexo B) e centrifugado (Centrífuga Excelsa[®] II – Mod. 206 BL - Fanem[®] - São Paulo, SP - Brasil) por 8 minutos a 300 x g. Entre as lavagens, os parâmetros espermáticos (motilidade, vigor e concentração espermática) foram avaliados. Após a realização da última centrifugação e avaliação dos parâmetros espermáticos foi realizada a avaliação da integridade das membranas espermática e acrossomal por meio da coloração de azul tripan (T8154-Trypan Blue solution 0,4% - Sigma-Aldrich – São Paulo, SP – Brasil) e Giemsa (Azur eosina-Azul de metileno Seg. Giemsa – Reagen Quimibrás Indústrias Químicas SA – Rio de Janeiro, RJ – Brasil), conforme preconizado por Didion et al. (1989). Essa lavagem teve como objetivo a avaliação dos parâmetros espermáticos após o descongelamento dos espermatozoides, sem a interferência dos métodos de seleção espermática, caracterizando o grupo controle.

Na figura 1, apresenta-se o esquema do presente ensaio.

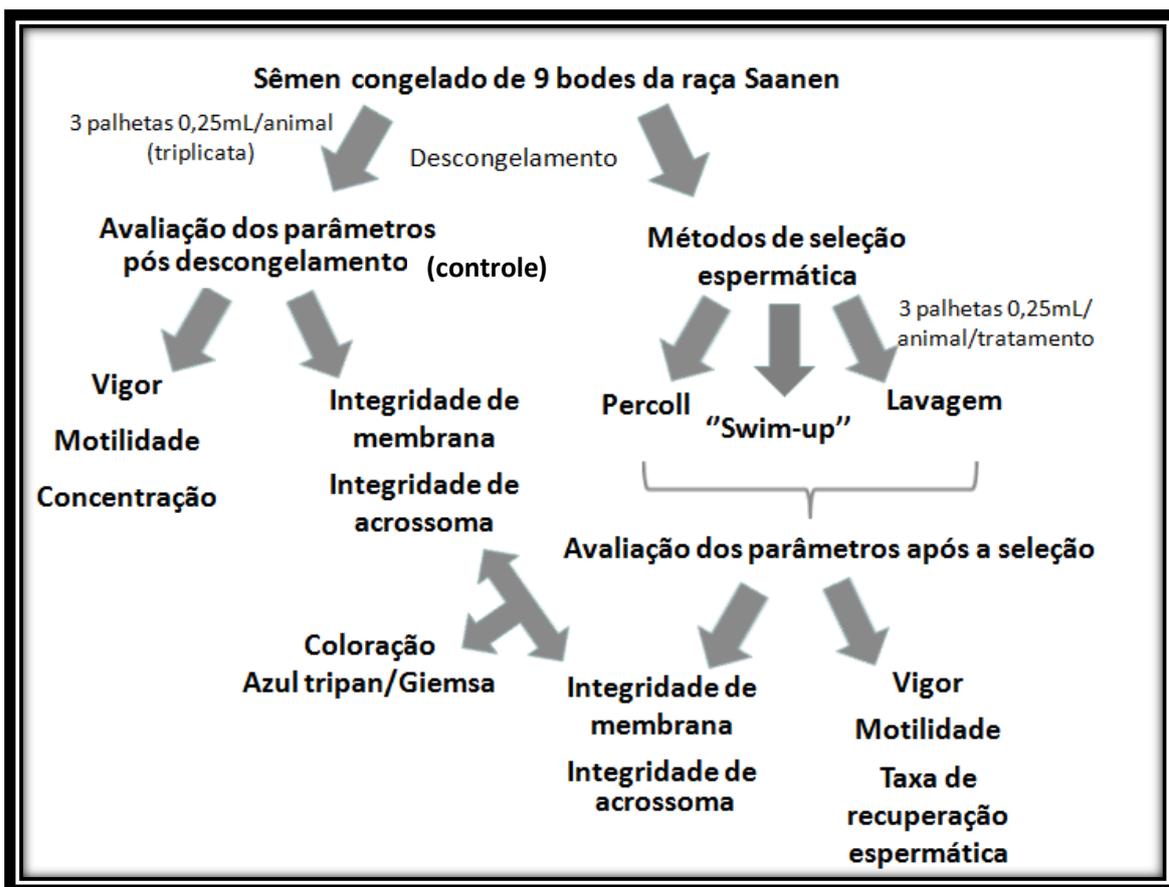


Figura 1. Esquema das avaliações após o descongelamento dos espermatozoides antes e após os métodos de seleção espermática.

3.3.2.1 Gradiente de Percoll

Inicialmente, foi adicionado a um microtubo, 400 μ L de gradiente de densidade de 90% e 45%, respectivamente, do gradiente de Percoll (Percoll 90% e 45% - Nutricell Nutrientes Celulares LTDA – Campinas, SP – Brasil). Após ser devidamente preparado, este tubo foi aquecido em bloco térmico (Placa aquecedora digital programável 500 – TK Equipamentos para reprodução – Uberaba, MG – Brasil) a 37° C. Uma dose contendo espermatozoides foi descongelada e despejada ao microtubo que foi encaminhado até a microcentrífuga (Centrifuge 5415C – Eppendorf do Brasil LTDA – São Paulo, SP - Brasil) onde foi submetido à centrifugação de 14000 x g por 5 minutos. Ao final da centrifugação, o microtubo foi retirado e o sobrenadante descartado. O “pellet” formado foi ressuspenso em 400 μ L de meio Talp Hepes. Posteriormente, o vigor e a motilidade foram reavaliados e a amostra foi novamente submetida à centrifugação de 14000 x g por 3 minutos. Após

a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” novamente ressuspenso com 200 µL de meio Talp HEPES. As avaliações de motilidade e vigor foram realizadas de forma subjetiva por um único avaliador. A concentração e a taxa de recuperação espermática também foram avaliadas. Uma alíquota de 150 µL da amostra final foi separada para a análise de integridade de membranas plasmática e acrossomal.

3.3.2.2 “Swim-up”

Os espermatozoides descongelados foram despejados cuidadosamente no fundo de um tubo de fundo cônico contendo 1 mL de Talp HEPES, evitando que se misturasse com o meio. O tubo foi levado para uma estufa de CO₂ (Automatic CO₂ Water-Jacketed Incubator Model 5430 – Napco Precision Scientific, Inc – Chicago - EUA) a 37° C onde permaneceu por uma hora posicionado em um ângulo de 45°, caracterizando o início do método de “Swim-up”. Após o tempo determinado, o tubo foi retirado da estufa, o sobrenadante (contendo os espermatozoides) foi retirado e depositado em outro tubo contendo 1 mL de meio Talp HEPES. Depois de devida homogeneização, foi realizada a avaliação do vigor e motilidade espermática e a amostra foi submetida à centrifugação de 300 x *g* por 8 minutos. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o “pellet” formado foi ressuspenso com 200 µL de meio Talp HEPES e os parâmetros espermáticos reavaliados, bem como a taxa de recuperação espermática. Foi realizada a separação de uma alíquota para avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal.

3.3.2.3 Lavagem de espermatozoides por centrifugação

Os espermatozoides, após serem descongelados, foram despejados em um tubo cônico de centrífuga contendo 10 mL de PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline – DMPBS/Flushing – Nutricell Nutrientes Celulares LTDA – Campinas, SP - Brasil) que foi submetido à centrifugação de 300 x *g* por 20 minutos. Posteriormente à centrifugação, o “pellet” formado foi ressuspensão em 500 µL de PBS e retirada uma pequena amostra para análise de vigor, motilidade, taxa de recuperação, integridade de membranas plasmática e acrossomal.

3.4 ENSAIO II – INDUÇÃO À CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

3.4.1 Preparo das substâncias indutoras da capacitação espermática

A substância utilizada para induzir a capacitação, o ON, foi obtida a partir do NPS (S0501-Sodium nitroprusside dihydrate - Sigma-Aldrich – São Paulo, SP – Brasil). O NPS foi pesado em alíquotas de 0,00298 g e diluído em 10 mL de Sperm Tyrode's Albumin-Lactate-Pyruvate (SPTL - Anexo C), resultando uma solução estoque de 1 mM. Esta solução foi fracionada em alíquotas de 200 µL em microtubos que foram mantidos congelados até o momento do uso.

A outra substância indutora utilizada foi a heparina (Heparin Sodium Salt – Sigma-Aldrich – São Paulo, SP – Brasil). Foi pesado 0,025 g de heparina e diluída em 5 mL de água autoclavada, resultando numa solução estoque de 5 mg de heparina/mL. A solução foi dividida em alíquotas de 200 µL em microtubos que foram mantidos congelados.

Após a indução da capacitação, os espermatozoides foram submetidos à indução da reação acrossomal, com o uso da lisofosfatidilcolina (LPC – L- α -Lysophosphatidylcholine from egg yolk - Sigma-Aldrich – São Paulo, SP – Brasil). Foi obtida uma solução estoque de 100 µg/ mL a partir da pesagem de 0,001 g de LPC e diluição em 10 mL de SPTL. A solução foi dividida em alíquotas de 500 µL que permaneceram congeladas.

3.4.2 Grupos experimentais

Foi realizado o descongelamento de três palhetas contendo espermatozoides que foram homogeneizadas em microtubo aquecido. As análises dos parâmetros espermáticos foram feitas imediatamente (vigor, motilidade e concentração espermática). Em seguida, a amostra foi dividida em alíquotas e vertida para microtubos aquecidos para a realização da lavagem (grupo controle) e para a realização da seleção espermática pelo método de Percoll (conforme metodologia utilizada no ensaio I).

A seleção espermática foi realizada em duplicata para a obtenção de concentração espermática suficiente para contagem dos espermatozoides após os procedimentos de indução da capacitação avaliados.

Após a realização da seleção espermática em duplicata, as amostras seminais dos dois microtubos foram avaliadas quanto aos parâmetros espermáticos, vertidas para um mesmo microtubo aquecido e homogeneizadas. A amostra final foi ajustada para um volume de 1250 μL de SPTL, corrigindo a concentração espermática para 50 milhões de espermatozoides.

A amostra foi dividida para cinco grupos experimentais, conforme apresentado na Tabela 2 e esquematizado na Figura 2. Foi transferido um volume de 250 μL da amostra final para cada grupo, de forma que cada um continha 10 milhões de espermatozoides. Todos os grupos foram incubados em estufa a 38,5° C com 5% de CO_2 e atmosfera umidificada, por 40 minutos (Zhou et al., 2004). Após este intervalo de tempo, os microtubos foram retirados da estufa para a adição de 100 μL de LPC e retornaram para a mesma, onde permaneceram por mais 15 minutos (Parrish et al., 1988).

Após o término das incubações, os microtubos foram submetidos à centrifugação de 300 x g por 3 minutos para sedimentação dos espermatozoides. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuspenso em 200 μL de SPTL. A amostra foi homogeneizada, o vigor e a motilidade foram avaliados e uma alíquota de 150 μL foi retirada para preparação da solução para análise de integridade de membranas plasmática e acrossomal por meio da coloração de ATG.

Quadro 1. Grupos experimentais – Indução à capacitação espermática – Ensaio II

Grupos	Metodologia
GI	Ausência de substâncias indutoras (controle): 250 µL SPTL contendo espermatozoides + 750 µL SPTL
GII	250 µL SPTL contendo espermatozoides + 740 µL SPTL + 10 µL de solução estoque de 5 mg de heparina/mL (50 µg de heparina/mL - Zhou et al., 2004)
GIII	250 µL SPTL contendo espermatozoides + 740 µL SPTL + 10 µL de solução estoque de 1 mM de NPS (10 µM de NPS - Boccia et al., 2007)
GIV	250 µL SPTL contendo espermatozoides + 700 µL SPTL + 50 µL de solução estoque de 1mM de NPS (50 µM de NPS - Rodriguez et al., 2005)
GV	250 µL SPTL contendo espermatozoides + 650 µL SPTL + 100 µL de solução estoque de 1mM de NPS (100 µM de NPS - Rodriguez et al., 2005)

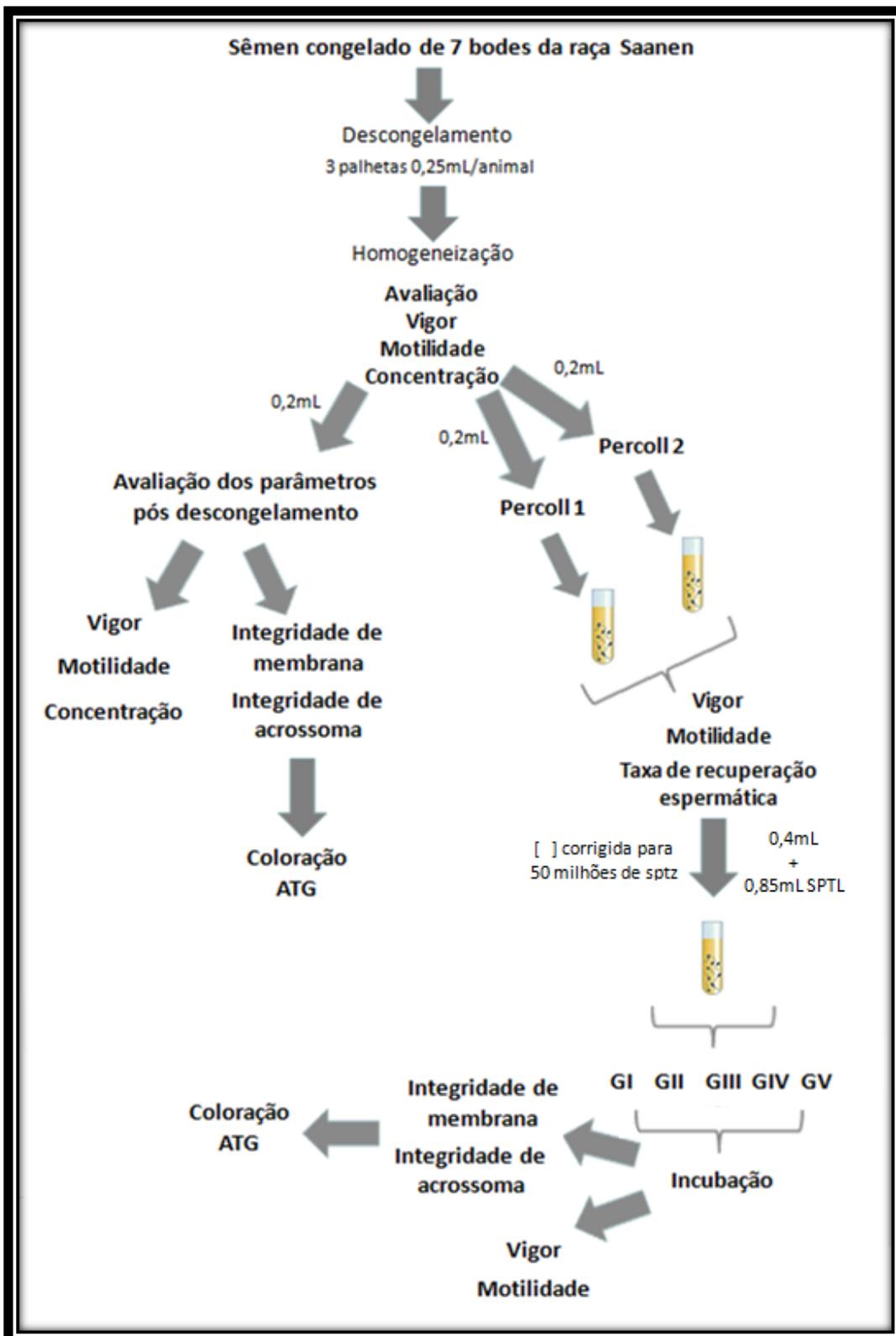


Figura 2. Esquema das avaliações após o descongelamento e após a indução à capacitação.

3.5 RESPOSTAS AVALIADAS

Imediatamente após o descongelamento, em todos os grupos experimentais, foram avaliados os seguintes parâmetros espermáticos: motilidade progressiva, vigor e concentração espermática.

Para análise do vigor e da motilidade, uma pequena alíquota foi colocada entre lâmina e lamínula aquecidas e avaliada, de forma subjetiva, no aumento de 400X em microscópio óptico de campo claro (Olympus BX41TF – Olympus Optical Company LTDA – Japão). O vigor foi classificado numa escala de 0 a 5 e a motilidade progressiva de 0 a 100% (CBRA, 1998).

A concentração espermática foi realizada a partir da diluição de 5 µL da palheta contendo espermatozoides em 2495 µL de água destilada (diluição de 1:500) em um microtubo. Essa solução foi devidamente homogeneizada e desta, foi retirada uma alíquota de 20 µL para contagem de espermatozoides na câmara de Neubauer no aumento de 400X em microscópio óptico de campo claro.

Ao final dos tratamentos, as amostras foram reavaliadas quanto a motilidade, vigor e concentração espermática, possibilitando assim a determinação da taxa de recuperação.

A taxa de recuperação espermática indica a quantidade de espermatozoides recuperados após a realização do método de seleção espermática. Esta taxa é calculada a partir da fórmula: $[\text{concentração final} \times \text{volume final}] \times [\text{concentração inicial} \times \text{volume inicial}]^{-1} \times 100$.

A avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal foi realizada por meio da coloração supravital dupla de ATG. Ao final de cada tratamento, a amostra final foi devidamente homogeneizada e desta foi retirada uma alíquota de 150 µL. Esta alíquota foi incubada com 50 µL de azul tripan a 0,4% (Anexo D) em um microtubo por 15 minutos a 37°C. Decorrido este tempo, foi adicionada à amostra 1 mL de meio Talp HEPES e realizada a centrifugação a 700 x g por 8 minutos para a retirada do excesso de corante. Esta lavagem foi repetida duas vezes, sendo desprezado o sobrenadante e ressuspendendo o “pellet” novamente com 1 mL de Talp HEPES. Em seguida, realizou-se esfregaços que foram secos rapidamente em fluxo de ar e fixados com álcool metílico por 5 minutos. Após a secagem, 1 mL de Giemsa a 10% (Anexo E) foi espalhado por toda a superfície do

esfregação, onde permaneceu por 3 a 4 horas. Decorrido este período de tempo, as lâminas foram lavadas com água destilada e os espermatozoides analisados quanto à integridade de membranas plasmática e acrossomal. Foi realizada a contagem, em triplicata, de 200 espermatozoides por lâmina, por intermédio da microscopia óptica com objetiva de imersão, no aumento de 1000X.

Os espermatozoides foram classificados de acordo com a integridade de membranas plasmática e acrossomal conforme a Tabela 3 e exemplificado na Figura 3.

Quadro 2. Classificação de espermatozoides por meio da técnica de coloração ATG

Classe	Coloração
Membranas plasmática e acrossomal intactas	Cabeça branca ou rosada com acrossoma rosa
Membrana plasmática intacta e acrossoma lesado	Cabeça branca ou rosada com acrossoma descorado
Membrana plasmática lesada e acrossoma intacto	Cabeça azul ou roxa com acrossoma roxo
Membranas plasmática e acrossomal lesadas	Cabeça azul ou roxa com acrossoma azul ou descorado

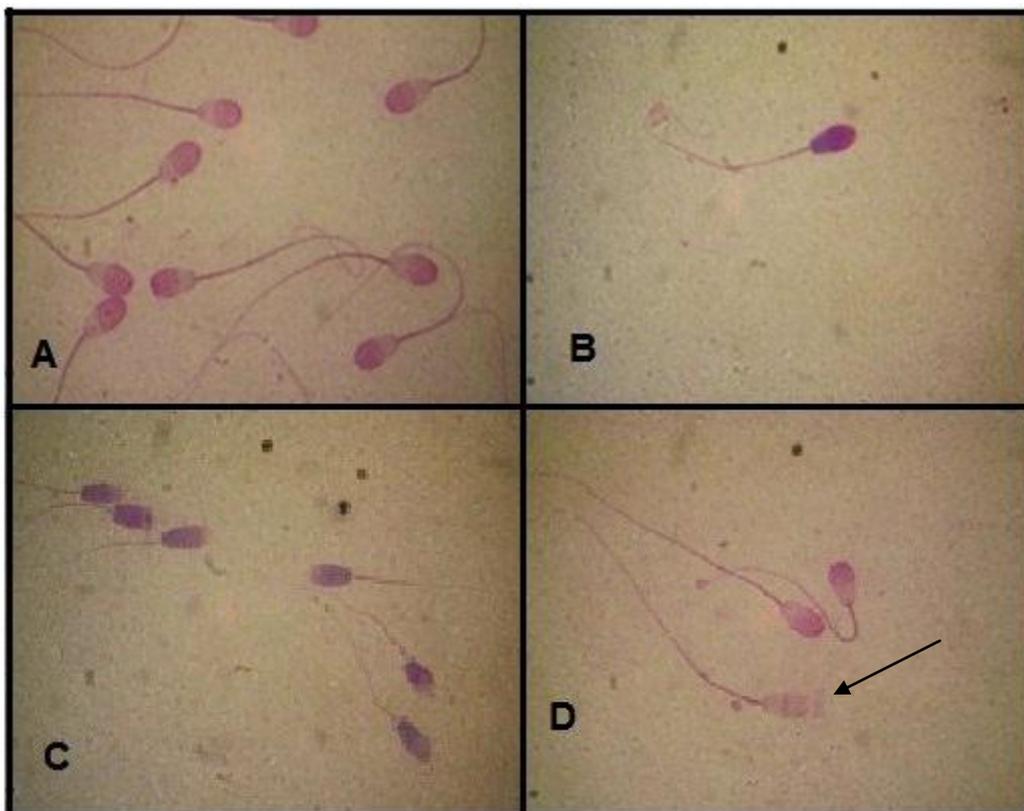


Figura 3. Classificação dos espermatozoides após a coloração ATG. A: espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas. B: espermatozoide com membrana plasmática lesada e acrossoma intacto. C: espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal lesadas. D: espermatozoide com membrana plasmática intacta e acrossoma lesado. Aumento de 1000X.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SASTM. Foram estudadas as seguintes respostas, nos dois ensaios realizados: motilidade espermática (%); vigor espermático (0-5); concentração espermática (espermatozoides/mL); taxa de recuperação espermática (%); taxa de integridade de MP (%) e taxa de integridade de acrossoma (%).

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de normalidade e homocedasticidade. Posteriormente foram avaliadas pela análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste Student Newman Keuls, adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIO I – AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE SELEÇÃO ESPERMÁTICA

Na tabela 1 são apresentados os valores espermáticos obtidos após a descongelação nos diferentes bodes utilizados. Observa-se que a concentração espermática variou em relação aos diferentes reprodutores ($P < 0,05$) utilizados. Os bodes A e D apresentaram concentrações superiores em relação aos bodes F, G, H e I. Assim, observa-se que não houve uma padronização da concentração no momento do congelamento, o que refletiu nas diferentes concentrações no momento pós-descongelamento. Nos demais parâmetros avaliados (motilidade, vigor e taxa de integridade de MP) não foram observados diferenças ($P > 0,05$) entre os machos utilizados.

Tabela 1. Valores espermáticos obtidos após a descongelação de espermatozoides de diferentes machos caprinos da raça Saanen (média \pm erro padrão)

Bode	Rep*	Concentração ($\times 10^6$ / mL)	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Sptz com membrana plasmática intacta (%)		Sptz com membrana plasmática lesada (%)	
					Acrossoma intacto	Acrossoma lesado	Acrossoma intacto	Acrosoma lesado
A	3	232,8 \pm 39,2 ^a	53,3 \pm 3,3	3,5 \pm 0,28	38,3 \pm 11,8	2,6 \pm 1,2	10,0 \pm 2,8	49,3 \pm 10,4
B	3	146,7 \pm 23,8 ^{a,b}	50,0 \pm 10,0	3,3 \pm 0,33	35,6 \pm 5,6	2,3 \pm 0,6	11,0 \pm 2,0	51,6 \pm 3,8
C	3	194,3 \pm 42,8 ^{a,b}	63,3 \pm 3,3	3,8 \pm 0,16	45,0 \pm 13,2	2,3 \pm 0,8	7,0 \pm 0,5	46,0 \pm 12,7
D	3	226,0 \pm 47,9 ^a	53,3 \pm 13,3	3,5 \pm 0,76	34,0 \pm 7,0	6,0 \pm 2,5	8,3 \pm 2,3	52,0 \pm 6,5
E	3	159,7 \pm 17,6 ^{a,b}	53,3 \pm 3,3	3,8 \pm 0,16	34,6 \pm 5,8	16,6 \pm 0,8	15,3 \pm 4,0	48,6 \pm 7,3
F	3	68,5 \pm 11,6 ^b	60,0 \pm 11,5	3,5 \pm 0,5	43,3 \pm 4,2	2,3 \pm 0,6	20,0 \pm 2,0	34,3 \pm 4,0
G	3	98,1 \pm 10,6 ^b	63,3 \pm 8,8	3,8 \pm 1,6	46,0 \pm 4,6	3,3 \pm 0,8	14,0 \pm 4,3	37,0 \pm 1,1
H	3	75,0 \pm 14,4 ^b	60,0 \pm 10,0	4,1 \pm 0,1	37,0 \pm 6,8	1,3 \pm 0,3	6,3 \pm 1,7	45,6 \pm 2,6
I	3	72,0 \pm 16,2 ^b	70,0 \pm 5,7	4,0 \pm 0,0	62,0 \pm 9,0	2,3 \pm 0,6	13,0 \pm 2,6	23,3 \pm 6,3
Média	27	134,0 \pm 54,4	58,5 \pm 13,6	3,7 \pm 0,6	43,9 \pm 15,8	2,67 \pm 2,15	11,5 \pm 5,7	43,0 \pm 12,2

^{a,b} médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($P < 0,05$), pelo teste de Student Newman Keuls.

*número de repetições para cada bode

Nas tabelas 2, 3 e 7 (Apêndice A) são apresentados os dados referentes aos parâmetros espermáticos obtidos antes e após os métodos de seleção espermática.

Tabela 2. Valores espermáticos obtidos antes (pós-descongelamento) e depois da realização de diferentes tratamentos para seleção espermática em espermatozoides congelados/descongelados de caprinos da raça Saanen (média ± erro padrão)

Tratamento	Rep*	Após descongelamento			Depois da seleção			Taxa de recuperação espermática (%)
		Concentração (x10 ⁶ / mL)	Motil. (%)	Vigor (1-5)	Concentração (x10 ⁶ / mL)	Motil. (%)	Vigor (1-5)	
“Swim-up”	27	126,1±11,2 ^b	55,1±1,9	3,5±0,09	3,5±0,7 ^c	41,1±5,0 ^b	4,0±0,16	2,27±0,3 ^c
Percoll	27	194,9±26,4 ^a	55,5±2,5	3,4±0,12	41,9±4,6 ^b	55,5±2,6 ^a	4,0±0,11	28,1±3,3 ^b
Centrifugação	27	122,0±12,3 ^b	51,8±2,9	3,3±0,09	55,4±7,0 ^a	50,7±3,2 ^a	4,2±0,08	43,3±3,8 ^a

^{a,b,c} médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05), pelo teste de Student Newman

Keuls.

*dados obtidos de nove machos em três repetições para cada bode. Duas observações de concentração foram perdidas para o tratamento “Swim-up”

Tabela 3. Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal obtidos antes (após o descongelamento) e depois da realização de diferentes tratamentos para seleção espermática em espermatozoides congelados/descongelados de caprinos da raça Saanen (média ± erro padrão)

Método de seleção espermática	Rep*	Sptz com membrana plasmática intacta (%)		Sptz com membrana plasmática lesada (%)	
		Acrossoma intacto	Acrossoma lesado	Acrossoma intacto	Acrossoma lesado
Antes	27	43,9±15,8	2,7±2,1 ^{a,b}	11,5±5,7 ^c	43,0±12,2 ^a
“Swim-up”	27	47,0±3,7	4,0±0,8 ^a	13,5±1,2 ^{b,c}	35,3±3,7 ^b
Percoll	27	45,7±2,4	1,8±0,3 ^b	18,5±1,6 ^a	34,1±2,0 ^b
Centrifugação	27	44,7±3,3	2,5±0,4 ^b	15,5±1,6 ^{a,b}	37,6±3,0 ^{a,b}

^{a,b,c} médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05), pelo teste de Student Newman

Keuls.

*dados obtidos de nove machos em três repetições para cada bode.

Avaliando os dados presentes na tabela 2, verifica-se que após a avaliação das técnicas de seleção espermática, observou-se que o método de centrifugação obteve uma maior concentração (P<0,05) de espermatozoides em relação às técnicas de Percoll e “Swim-up” (55,4±7,0% vs. 41,9±4,6% vs. 3,5±0,7%, respectivamente), refletindo em uma maior taxa de recuperação espermática (P<0,05) quando comparada aos demais métodos de seleção (43,3±3,8%, 28,1±3,3% e 2,27±0,3%, respectivamente). Em relação à motilidade avaliada posteriormente ao procedimento de seleção, o método de “Swim-up” (41,1±5,0%) apresentou menor valor (P<0,05) quando comparado ao método Percoll (55,5±2,6%)

e ao método de lavagem por centrifugação (50,7±3,2%). O vigor não diferiu ($P>0,05$) entre as diferentes técnicas de seleção utilizadas.

Não houve diferença ($P>0,05$) na proporção de espermatozoides com MP intacta e acrossoma intacto entre todos os grupos experimentais (43,9±15,8%; 47,0±3,7%, 45,7±2,43% e 44,7±3,3% para antes da realização dos tratamentos de seleção). A proporção de espermatozoides com MP intacta e acrossoma lesado foi maior para o método de “Swim-up” (4,0±0,8%) do que para os demais métodos de seleção espermática (1,8±0,3% para método Percoll e 2,5±0,4% para a lavagem), porém, este parâmetro não diferiu ($P>0,05$) entre o método de “Swim-up” e a análise anterior à seleção (4,0±0,8% e 2,67±2,15%, respectivamente). Houve diferença ($P<0,05$) na taxa de espermatozoides com MP lesada e acrossoma intacto, entre os métodos de Percoll e centrifugação em relação à análise anterior (18,5±1,6%, 15,5±1,6% e 11,5±5,7%, respectivamente), porém não houve diferença ($P>0,05$) neste parâmetro entre a análise anterior e o método de “Swim-up” (13,5±1,2%). Não houve diferença ($P>0,05$) na porcentagem de células com MP lesada e acrossoma lesado entre os tratamentos. Ao realizar a comparação dessa mesma subpopulação, entre o momento anterior e os tratamentos, houve diferença ($P<0,05$). Ainda em relação às células com MP lesada e acrossoma lesado, não foi observada diferença ($P>0,05$) entre a análise anterior (43,0±12,2%) e centrifugação (37,6±3,0%). Esses resultados podem ser observados na tabela 3.

Na tabela 4, verifica-se que houve interação entre animal e método de seleção. As taxas de espermatozoides com MP intacta e acrossoma intacto ($P=0,0004$) e total de espermatozoides com MP intacta ($P=0,0002$) variaram de acordo com os bodes, enquanto os demais métodos não foram afetados pelo uso de espermatozoides criopreservados de diferentes machos.

Tabela 4. Efeito da interação entre animal e método de seleção sobre os parâmetros de integridade de membranas plasmática e acrossoma de diferentes machos caprinos da raça Saanen (média ± erro padrão)

Bode	Rep*	"Swim-up"		Percoll		Centrifugação	
		Sptz com membrana plasmática intacta (%)	Acrossoma intacto (%)	Sptz com membrana plasmática intacta (%)	Acrossoma intacto (%)	Sptz com membrana plasmática intacta (%)	Acrossoma intacto (%)
A	3	29,3±9,3 ^{b,c}	28,6±9,0 ^{b,c}	46,3±7,8	45,0±8,0	52,0±16,0	50,6±15,3
B	3	52,0±8,1 ^{a,b,c}	50,0±7,3 ^{a,b,c}	40,6±12,1	39,3±11,3	33,6±5,5	30,3±4,0
C	3	68,0±7,0 ^{a,b}	57,0±4,5 ^{a,b,c}	42,6±4,0	40,3±4,0	37,6±10,1	33,3±9,2
D	3	72,0±7,9 ^a	64,0±4,5 ^{a,b}	42,0±5,8	38,3±8,0	35,3±3,1	33,0±3,0
E	3	63,3±10,5 ^{a,b,c}	60,6±11,6 ^{a,b,c}	38,3±1,7	37,3±2,0	40,3±7,8	39,3±7,8
F	3	22,3±8,4 ^c	20,3±7,8 ^c	61,3±4,9	59,3±5,3	55,3±11,0	52,0±11,5
G	3	62,3±8,6 ^{a,b,c}	60,0±8,5 ^{a,b,c}	45,6±0,3	43,6±0,8	52,0±3,0	50,3±2,9
H	3	30,6±14,5 ^{a,b,c}	28,0±2,6 ^{b,c}	54,6±6,6	53,3±7,3	45,0±6,2	43,3±5,4
I	3	62,0±4,5 ^{a,b,c}	58,3±5,9 ^{a,b}	56,3±7,4	54,6±7,6	72,6±6,6	70,6±6,8

^{a,b,c} médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05), pelo teste de Student Newman Keuls.

*número de repetições para cada bode.

Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados por Rho et al. (2001), ao compararem as técnicas de Percoll e "Swim-up" em espermatozoides criopreservados de caprinos. Os autores observaram que a taxa de recuperação pós Percoll e pós "Swim-up" foi respectivamente de 33,9% e 7,7%. O mesmo foi demonstrado por Parrish et al. (1995), que após a avaliação de sêmen congelado de touros, observaram que a taxa de recuperação espermática foi maior após a realização do Percoll (40%), sendo 4 a 6 vezes maior do que a taxa de recuperação após a realização do "Swim-up" (9%). As taxas de recuperação após a realização do método de "Swim-up" e do Percoll observadas no presente estudo foram menores (2,27±0,3% e 28,1±3,3%, respectivamente), possivelmente pelo fato dos autores terem utilizado um volume total de 1 mL durante as técnicas, enquanto que no presente estudo, foi utilizado 250 µL, havendo uma proporcionalidade entre as taxas encontradas.

A baixa taxa de recuperação após a realização da técnica de "Swim-up" encontrada no presente estudo está de acordo com a maioria dos relatos encontrados na literatura e pode ser explicada pelo fato de que o processo de migração ascendente garante que somente os espermatozoides móveis cheguem até o topo do meio, de onde são recuperados, mimetizando laboratorialmente o processo de seleção espermática que ocorre naturalmente na junção útero-tubárica

do aparelho reprodutor feminino (Ng et al., 1992). Dessa forma, há a evidenciação de um número reduzido de espermatozoides presentes em uma amostra que se encontram aptos ao processo de fertilização (Rodríguez-Martínez et al., 1997).

Parrish et al. (1995), afirmaram que a seleção espermática pelo método de Percoll é simples, mais rápida e apresenta uma taxa de recuperação espermática significativamente maior do que o “Swim-up”, fato este também observado no presente estudo. A única deficiência desse método é a menor taxa de penetração oocitária, quando comparada a técnica de “Swim-up”, quando são utilizadas as mesmas concentrações espermáticas. Porém os autores afirmam que esta taxa pode ser melhorada simplesmente pelo aumento da concentração espermática antes da FIV, o que pode ser facilmente corrigido já que a taxa de recuperação espermática após a recuperação do Percoll é alta. Assim, apesar de a técnica de Percoll ter apresentado maior taxa de recuperação espermática no presente estudo, essa maior taxa pode não necessariamente determinar maiores taxas de fertilização.

No presente estudo, a maior taxa de recuperação espermática foi encontrada após a lavagem por centrifugação ($43,3 \pm 3,8\%$; $P < 0,05$), o que pode ser explicado pelo método não recuperar somente os espermatozoides de melhor qualidade. Esta técnica se trata de um processo de preparação espermática visando a lavagem espermática para retirada de crioprotetores e células indesejáveis. Sendo assim, não pode ser considerada como uma técnica de seleção espermática e pode não apenas selecionar os espermatozoides de melhor qualidade. Essa afirmação foi confirmada por Harrison (1976), que ao avaliar espermatozoides de suínos após a lavagem, encontrou um elevado número de espermatozoides mortos, danificados e com morfologia anormal, que provavelmente foram responsáveis pela redução dos resultados positivos encontrados após a FIV.

Correa e Zavos (1996), demonstraram que o percentual de células com MP intacta e acrossoma lesado após o “Swim-up” aumentou significativamente quando comparado com o método de Percoll. Esse resultado está de acordo com o presente estudo, onde foi encontrada uma taxa maior ($P < 0,05$) de espermatozoides com MP intacta e acrossoma lesado após a realização do “Swim-up”, em relação às técnicas de Percoll e centrifugação ($4,0 \pm 0,8\%$, $1,8 \pm 0,3\%$ e $2,5 \pm 0,4\%$, respectivamente). Além disso, no presente estudo, a taxa de motilidade após a realização da técnica de “Swim-up” foi menor ($P < 0,05$) quando comparada com as demais técnicas

(41,1±5%, 55,5±2,6% e 50,7±7%, respectivamente). Os autores afirmam que esses resultados indicam que os espermatozoides, após migrarem para a porção superior do meio de cultura durante o processo de “Swim-up”, acabam sofrendo estresse oxidativo devido ao longo intervalo de incubação da técnica. Tais achados contrariam os reportados por Parrish e Foote (1987) e Somfai et al. (2002) que demonstraram a efetividade do método de “Swim-up” para a recuperação de subpopulações espermáticas apresentando maior motilidade e integridade das membranas plasmáticas e acrossomais de bovinos. Talvez estas diferenças encontradas ocorram devido às características da espécie avaliada no presente estudo.

Estudos apontam o fenômeno de diluição como o possível responsável para o aumento de células espermáticas com acrossoma lesado após a realização da técnica de “Swim-up”. Tal fato se dá pela adição de um meio diluente que é o responsável pela remoção de secreções do trato reprodutivo do macho (Correa e Zavos, 1996; Gil et al., 2000; Dode et al., 2002; Folchini et al., 2012). A retirada dessas substâncias pode provocar a desestabilização da membrana acrossomal tendo como consequência a reação acrossomal.

Os dados encontrados no presente estudo podem ser justificados a partir dos resultados obtidos em outros estudos. Schoneck et al. (1996), ao avaliarem sêmen de touros, especularam que a diluição dos espermatozoides promoveu um estresse oxidativo. Maxwell e Johnson (1999) constataram a mesma observação, ao avaliarem espermatozoides de suínos e verificarem que o efeito diluição reduziu a motilidade e aumentou a taxa de MP lesada.

O maior percentual de células com acrossoma lesado após a técnica de “Swim-up”, observado no presente estudo, pode ser explicado devido ao fato de o efeito diluição promover a geração excessiva de ERO que induz o início da lipoperoxidação da membrana celular levando a perda da fluidez de membrana, essencial para a manutenção da integridade de membranas plasmática e acrossomal (Graham et al., 1990). Além disso, alguns estudos constataram que a geração de ERO aumenta durante o tempo de incubação (Correa e Zavos, 1996; Pérez et al., 1996; Dode et al., 2002; Henkel e Schill, 2003). Essa afirmação sugere uma associação entre o longo intervalo de incubação da técnica de “Swim-up” e a ocorrência de acrossoma lesado.

Baseando-se no efeito diluição, o fato do “Swim-up” ter apresentado menor motilidade quando comparada com os outros métodos, pode ser elucidado. A diluição espermática possivelmente gera uma menor interferência competitiva entre os espermatozoides para a migração através do fluido, favorecendo o deslocamento de células que mesmo apresentando lesões de membrana, preservaram a motilidade. Nesse sentido, os espermatozoides encontram-se com maior liberdade para execução do movimento, havendo um menor número de colisões e, portanto, uma menor interferência da trajetória celular. Devido à ação das ERO, essas células que alcançaram a porção superior do meio e que permaneceram por um longo intervalo de tempo expostas a estas substâncias, podem ter apresentado maior chance de morrer e sofrer degeneração celular seguida de perda acrossomal. Esse evento caracteriza o processo denominado de falsa reação acrossomal, onde ocorre perda do acrossoma após a morte celular, caracterizando a subpopulação de espermatozoides com MP lesada e acrossoma lesado. Com isso, pode haver queda de motilidade resultando em uma menor efetividade de seleção ao final da metodologia.

Nesse sentido, como a metodologia de “Swim-up” utilizada no presente experimento foi submetida à incubação das amostras por 1 hora, possivelmente os espermatozoides permaneceram expostos aos malefícios ocasionados pelo excesso de ERO. Sendo assim, sugere-se um aumento da proporção de células com MP intacta e acrossoma lesado, células com MP lesada e acrossoma lesado e menor motilidade ao final das avaliações após a seleção.

Kim et al. (1999) afirmaram que a geração de ERO varia de um indivíduo para outro, o que pode explicar a variação individual no total de células com MP intacta e espermatozoides com MP intacta e acrossoma intacto observadas no presente estudo após a técnica de “Swim-up”. Esses resultados podem ser verificados na tabela 4 onde é observada interação entre os diferentes machos e o método de “Swim-up”.

Diversos estudos correlacionaram a superioridade do método de “Swim-up” com a maior recuperação de células móveis, quando o mesmo parâmetro é avaliado após a realização da técnica de Percoll (Liu e Baker, 1992; Palomo et al., 1999; Nayar et al., 2006; Mehmoooh et al., 2009). Entretanto, esses resultados não estão de acordo com o presente estudo, onde foi encontrado um aumento ($P < 0,05$) na

motilidade espermática após o Percoll ($55,5\pm 2,6\%$) quando comparada à técnica de “Swim-up” ($41,1\pm 5,0\%$). Há a possibilidade do presente estudo ter apresentado este baixo índice de motilidade após a realização do método de “Swim-up” devido a associação do efeito diluição e suas consequências e ao longo período de incubação atribuído à técnica, como anteriormente explicado. Também há a possibilidade de estes resultados serem associados à ausência de cafeína no meio de seleção. Essa substância está presente na maioria dos meios de preparação espermática e exerce estímulo direto sobre a motilidade espermática (Pérez et al., 1996), sendo essencial para processos de longo período de incubação como a FIV e o “Swim-up”.

Segundo Gil et al. (1999) o tempo e a força de centrifugação utilizados na técnica de Percoll influenciam na recuperação espermática e na qualidade de células recuperadas. Essa afirmação pôde ser confirmada no presente estudo, ao ser utilizada uma força gravitacional de $14000 \times g$ no protocolo de Percoll. Esta pode não ter sido responsável pela seleção somente de células móveis e viáveis. Possivelmente, o excesso de força foi responsável por forçar células imóveis, menos móveis e mortas a migrarem por entre as colunas de gradiente de densidade, até alcançarem o “pellet” de espermatozoides de melhor qualidade, aumentando a concentração espermática e de células de pior qualidade. Segundo Ng et al. (1992), esse fato explica a similaridade de valores de motilidade obtidos no presente estudo, nos momentos pós Percoll e pós descongelamento ($55,5\pm 2,6\%$ e $55,5\pm 2,5\%$, respectivamente).

Somfai et al. (2002), utilizando sêmen congelado de bovinos após a realização da técnica de Percoll ($300 \times g$ por 10 minutos), verificaram um menor percentual de células com MP lesada e acrossoma intacto quando comparado com o momento após o descongelamento (1,8% e 10,9%, respectivamente). Esses resultados vão de encontro aos encontrados no presente estudo, onde foi observada uma maior ($P < 0,05$) taxa de células com MP lesada com acrossoma intacto após a realização da técnica de Percoll quando comparado com o momento pós-descongelamento ($18,5\pm 1,6\%$ e $11,5\pm 5,7\%$, respectivamente).

Folchini et al. (2012), ao submeterem uma força de $9000 \times g$ no protocolo de Percoll para avaliação de sêmen congelado de bovinos, verificaram que a motilidade após a técnica (54%) foi inferior ($P < 0,05$) ao momento seguido da descongelação

(79%). Esses dados diferem dos encontrados na literatura, possivelmente pelo fato do autor ter utilizado a metodologia do mini-Percoll. Apesar de o presente estudo utilizar esta mesma metodologia, os resultados não estão de acordo, possivelmente pela maior força atribuída no presente estudo, que levou à motilidade ser semelhante ao momento pós-descongelamento.

Possivelmente no presente estudo, a maior porcentagem de espermatozoides apresentando MP lesada e acrossoma intacto após a realização da técnica de Percoll e após a lavagem por centrifugação ($18,5 \pm 1,6\%$ e $15,5 \pm 1,6\%$, respectivamente) deu-se devido ao efeito da centrifugação. Conforme citado anteriormente, durante o método de Percoll, as células menos viáveis e menos móveis são forçadas a chegarem ao fundo do microtubo, que induzidas pelos danos mecânicos do processo de centrifugação, produzem ERO (Aitken e Clarkson, 1988). Esses radicais livres se desprendem das membranas plasmáticas dessas células e afetam as células ao redor (Aitken e Clarkson, 1988). A maior taxa de espermatozoides com MP lesada e acrossoma intacto se deu, possivelmente, pelo fato dessas células terem sofrido lesões de MP e morrerem antes de sofrerem a reação acrossomal. Por conta do curto período de centrifugação submetido à técnica (5 minutos) no presente experimento, pode não ter ocorrido a degeneração celular, e os espermatozoides são corados e fixados ainda com o acrossoma intacto.

Essa explicação também deve ser levada em consideração para os danos durante a técnica de lavagem por centrifugação. Conforme citado anteriormente, este método não apresenta a capacidade de selecionar espermatozoides, conseqüentemente, há a possibilidade de uma maior recuperação de espermatozoides menos viáveis. Em conseqüência dos possíveis danos causados pela força de centrifugação imposta, esses espermatozoides podem afetar as células ao redor, podendo propiciar uma alta taxa de recuperação de células com MP lesada ($37,6 \pm 3,0\%$ de células com MP lesada e acrossoma lesado e $15,5 \pm 1,6\%$ de células com MP lesada e acrossoma intacto).

Gil et al. (1999), avaliando dois protocolos de congelamento de espermatozoides de ovinos, observaram que o protocolo que envolvia uma etapa de centrifugação ($700 \times g$ por 10 minutos) apresentou maior motilidade ($77,8 \pm 3,4\%$) quando comparado com o protocolo que apenas diluiu os espermatozoides ($70,4 \pm 3,4\%$ - $P < 0,01$). Além disso, os autores constataram uma maior taxa de

acrossoma lesado no protocolo de diluição ($39,1 \pm 1,7\%$ vs. $29,4 \pm 1,7\%$ - $P < 0,01$), o que está de acordo com as observações do presente estudo.

Palomo et al. (1999), avaliando os métodos de lavagem por centrifugação, Percoll e “Swim-up” em sêmen fresco de caprinos, evidenciaram a superioridade ($P < 0,0005$) do método de “Swim-up” em relação a todos os parâmetros avaliados (motilidade, integridade de membrana e de acrossoma). Esses resultados são distintos dos encontrados no presente experimento, onde a motilidade foi menor ($P < 0,05$) no método de “Swim-up” e não houve diferença para os outros parâmetros entre os tratamentos. Em relação ao percentual de células com MP intacta e acrossoma lesado, os autores não observaram efeito do método de seleção espermática sobre os diferentes machos, o que não está de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, onde houve interação individual com a técnica de “Swim-up” ($P < 0,05$). Contudo, os autores não encontraram diferença entre os tratamentos, assim como não houve diferença entre os tratamentos e os espermatozoides não submetidos a nenhum método de seleção em relação aos resultados após a FIV. Assim, os autores concluíram que não é necessário o uso de técnicas de seleção espermática ou lavagem para a preparação de sêmen fresco de caprinos. Para os espermatozoides criopreservados, esta etapa de preparação espermática é indispensável, para selecionar células de melhor qualidade cuja funcionalidade se manteve preservada após o processo de criopreservação, a fim de aumentar a taxa de fertilização. Possivelmente, a divergência entre os resultados encontrados no presente estudo, se deu exatamente pelo fato dos autores terem utilizado sêmen fresco.

4.2 ENSAIO II – AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE INDUÇÃO À CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

Na tabela 5 são apresentados os parâmetros espermáticos obtidos após a descongelamento espermática nos diferentes animais. Verifica-se que houve diferença ($P < 0,05$) entre os indivíduos após o descongelamento, para os parâmetros concentração espermática e espermatozoides com MP lesada e acrossoma lesado.

Tabela 5. Valores espermáticos obtidos após a descongelação de espermatozoides de diferentes machos caprinos da raça Saanen (média ± erro padrão)

Bode	Rep *	Concentração (x10 ⁶ / mL)	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Sptz com membrana plasmática intacta (%)		Sptz com membrana plasmática lesada (%)	
					Acrossoma intacto	Acrossoma lesado	Acrossoma intacto	Acrossoma lesado
A	3	545,8±114,2 ^a	60,0±0,0	3,7±0,2	29,2±7,4	3,6±0,6	14,5±3,7	52,7±10,5 ^{a,b}
B	3	195,8±23,2 ^c	53,3±8,8	3,2±0,2	36,6±3,5	2,2±0,6	13,9±3,9	48,9±1,8 ^{a,b}
C	3	516,7±79,5 ^{a,b}	53,3±12,0	3,2±0,3	21,8±9,1	2,4±1,7	9,0±2,5	66,8±12,6 ^a
D	3	337,5±45,1 ^c	63,3±6,7	3,7±0,2	33,2±5,4	2,1±0,6	20,1±5,7	44,7±2,9 ^{a,b,c}
E	3	318,7±29,5 ^c	56,7±3,3	3,3±0,3	44,2±4,9	1,9±0,3	16,8±2,6	37,2±4,6 ^c
F	3	370,8±48,1 ^{a,b}	56,7±8,8	3,3±0,2	29,8±2,5	1,6±0,6	21,5±5,6	47,1±3,1 ^{a,b,c}
G	3	329,2±34,1 ^c	60,0±0,0	3,0±0,0	30,6±15,5	0,7±0,6	12,4±7,4	23,0±11,5 ^c
Média	21	373,5±146,5	57,6±11,1	3,3±0,4	31,9±13,7	2,1±1,3	15,5±8,2	45,7±14,9

^{a,b,c} médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05), pelo teste de Student Newman Keuls.

*número de repetições para cada bode

A tabela 6 apresenta os valores espermáticos de caprinos após o descongelamento e após serem submetidos aos cinco tratamentos de indução da capacitação espermática. Na tabela 8 (Apêndice B) são apresentados os valores espermáticos obtidos após a realização de três procedimentos de centrifugação dos diferentes machos após a seleção espermática pelo Percoll, anteriormente a realização da incubação com os agentes indutores da capacitação. Na tabela 9 (Apêndice C) é apresentado o efeito da interação entre indivíduos e indução à capacitação sobre a integridade de membranas plasmática e acrossomal.

Tabela 6. Valores espermáticos obtidos após o descongelamento e após diferentes protocolos de indução da capacitação espermática em diferentes machos caprinos da raça Saanen (média \pm erro padrão)

	Rep*	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Sptz com membrana plasmática intacta (%)		Sptz com membrana plasmática lesada (%)	
				Acrossoma intacto	Acrossoma lesado	Acrossoma intacto	Acrossoma lesado
Pós-descongelamento	21	57,6 \pm 2,4 ^a	3,3 \pm 0,1 ^d	32 \pm 2,9 ^a	2,1 \pm 0,3	15,5 \pm 1,8	45,8 \pm 3,8
GI (controle)	21	34,0 \pm 3,9 ^{b,c}	4,2 \pm 0,1 ^c	19,1 \pm 2,3 ^b	2,5 \pm 0,1	19,8 \pm 0,2	53,8 \pm 4,1
GII	21	28,1 \pm 3,6 ^c	4,3 \pm 0,2 ^{b,c}	16,8 \pm 1,9 ^b	2,5 \pm 0,4	24,6 \pm 2,5	51,4 \pm 4,3
GIII	21	34,3 \pm 3,1 ^{b,c}	4,5 \pm 0,1 ^{a,b}	20,7 \pm 2,5 ^b	2,9 \pm 0,4	20,1 \pm 2,3	51,6 \pm 4,1
GIV	21	36,2 \pm 3,1 ^{b,c}	4,5 \pm 0,1 ^{a,b}	19,0 \pm 2,3 ^b	3,6 \pm 0,6	21,3 \pm 2,6	52,5 \pm 4,2
GV	21	38,3 \pm 3,5 ^b	4,7 \pm 0,1 ^a	20,8 \pm 2,3 ^b	2,9 \pm 0,4	20,4 \pm 2,1	51,3 \pm 3,9

^{a,b,c} médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($P < 0,05$), pelo teste de Student Newman Keuls.

*número de repetições para cada bode

GI: ausência de substâncias indutoras (controle): 250 μ L SPTL contendo espermatozoides + 750 μ L SPTL; GII: 250 μ L SPTL contendo espermatozoides + 740 μ L SPTL + 10 μ L de solução estoque de 5 mg de heparina/mL (50 μ g de heparina/mL); GIII: 250 μ L SPTL contendo espermatozoides + 740 μ L SPTL + 10 μ L de solução estoque de 1 mM de NPS (10 μ M de NPS); GIV: 250 μ L SPTL contendo espermatozoides + 700 μ L SPTL + 50 μ L de solução estoque de 1 mM de NPS (50 μ M de NPS); GV: 250 μ L SPTL contendo espermatozoides + 650 μ L SPTL + 100 μ L de solução estoque de 1 mM de NPS (100 μ M de NPS)

Verifica-se que a motilidade no momento pós descongelamento foi maior ($P < 0,05$) em relação aos grupos experimentais, entretanto, não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos expostos ao NPS (GIII, IV e V) e o grupo controle (GI). A motilidade diferiu ($P < 0,05$) entre o grupo exposto à maior concentração de NPS (GV - 38,3 \pm 3,5%) e o grupo exposto à heparina (GII - 28,1 \pm 3,6%). Houve diferença ($P < 0,05$) em relação ao vigor entre os grupos experimentais e o momento pós descongelamento, onde foi observado um aumento do vigor quando da realização do procedimento de indução da capacitação. Foi constatada diferença ($P < 0,05$) entre os grupos tratados com NPS e o grupo controle em relação ao vigor, onde foi observado maior vigor para o GV (4,7 \pm 0,1 – $P < 0,05$) quando comparado ao grupo tratado com heparina (4,3 \pm 0,2). A porcentagem de células com MP intacta e acrossoma intacto diferiu ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais e o momento pós descongelamento, porém essa diferença não foi observada ($P > 0,05$) entre os tratamentos. A subpopulação de espermatozoides com MP intacta e acrossoma lesado não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Não houve diferença ($P > 0,05$) no total de células com MP lesada entre os grupos tratados e após o descongelamento.

Moran et al. (2008), ao avaliarem o efeito de 400 μM de NPS sobre as membranas plasmáticas de espermatozoides resfriados de suínos, observaram que após 1 hora de incubação a 38° C com o reagente, houve um aumento ($P < 0,001$) de espermatozoides com MP intacta apresentando atividade de proteínas envolvidas na via apoptótica (caspases), em relação ao grupo controle ($76,2 \pm 13,25\%$ e $9,3 \pm 3,6\%$, respectivamente). Os autores também observaram que NPS induziu um aumento ($P < 0,001$) na porcentagem de espermatozoides com aumento da permeabilidade de membrana, sendo essa característica semelhante às alterações de membrana que ocorrem durante o processo apoptótico, justificando o aumento da atividade das caspases. No presente estudo, não houve diferença ($P > 0,05$) na taxa de espermatozoides com MP intacta e acrossoma intacto entre os grupos experimentais em relação ao grupo controle e ao grupo exposto à heparina, sugerindo que o NPS, nas concentrações utilizadas (10-100 μM), não inferiu danos às membranas espermáticas. Esse fato pode ser confirmado uma vez que não houve diferença ($P > 0,05$) em relação à subpopulação de espermatozoides com MP intacta e com acrossoma intacto entre o grupo experimental cuja concentração de NPS foi maior (GV – $20,8 \pm 2,3\%$) e o grupo controle ($19,1 \pm 2,3\%$).

Resultados semelhantes ao presente estudo, foram demonstrados por Ferreira-Berbari et al. (2010), que ao avaliarem a ação da enzima ON sintase induzível (INOS – enzima envolvida na reação de formação do ON) na qualidade espermática de bovinos, verificaram que a adição de 500 μM de NPS impediu a ação deletéria na integridade da membrana dos espermatozoides, resultando em valores semelhantes em relação ao grupo controle ($P > 0,05$). Além disso, os autores observaram que, após a adição de substâncias inibidoras de INOS, houve queda significativa ($P < 0,05$) da integridade de membrana quando comparado com os grupos controle e ao grupo exposto ao NPS.

Vale ressaltar que a criopreservação induz a formação de um excesso de ERO, que por sua vez, aumenta os danos à integridade de membranas espermáticas (Watson, 2000). Conforme discutido no ensaio I, a metodologia adotada durante a técnica de Percoll, possivelmente pode ter induzido a recuperação de subpopulações espermáticas de baixa qualidade, sendo, provavelmente, mais sensíveis a um intervalo de incubação prolongado. Além disso, após a incubação, as amostras foram submetidas à centrifugação a 300 x g por 3

minutos para formação de um “pellet” composto de espermatozoides a fim de facilitar a avaliação dos parâmetros espermáticos. Os espermatozoides de baixa qualidade são mais sensíveis aos danos mecânicos causados pela força de centrifugação, tendo como consequência a liberação de ERO, afetando os espermatozoides ao redor. Esse fato pode explicar a diminuição ($P < 0,05$) da motilidade e da subpopulação de espermatozoides com MP intacta com acrossoma intacto em todos os tratamentos quando comparados com a análise pós descongelamento. Adicionalmente, não houve diferença ($P > 0,05$) em relação às subpopulações de espermatozoides com MP lesada entre os grupos experimentais e o pós descongelamento, o que pode ter sido obtido pela baixa eficácia sugerida pela metodologia de seleção espermática aplicada antes da incubação, durante a técnica de Percoll.

Em situações semelhantes ao do presente estudo, Zhou et al. (2004), ao avaliarem a capacitação de espermatozoides de caprinos pela heparina, obtiveram uma taxa de 55% e 56% de capacitação após 45 minutos de incubação com 50 e 100 μg de heparina/mL, respectivamente. Os autores também observaram que o percentual de capacitação aumentou conforme o intervalo de incubação com 50 μg de heparina/mL. Embora não tenha sido observada diferença ($P > 0,05$) no percentual de células capacitadas entre os intervalos de 45 e 120 minutos, houve queda significativa ($P < 0,05$) de motilidade e viabilidade espermática após 120 minutos de incubação. Os autores concluíram que o tempo de incubação de 45 minutos e a utilização de 50 μg de heparina/mL, são ideais para a capacitação de espermatozoides de caprinos. Apesar das condições de incubação serem semelhantes, esses dados não estão de acordo com os observados no presente estudo, no qual foi verificada uma taxa de $2,5 \pm 0,4\%$ de capacitação após a incubação com 50 μg de heparina/mL durante 40 minutos.

Segundo Januskauskas et al. (2000), células com acrossoma lesado não reagem ao efeito capacitante da heparina, em razão da não ligação da mesma aos sítios de fixação da membrana acrossomal externa, que se perderam antes de ocorrer a reação com a substância. Esses dados sugerem que o tempo de incubação, utilizado no presente estudo, pode ter sido suficiente para ocorrer a capacitação. Por outro lado, possivelmente, a heparina pode ter apresentado baixa eficiência em relação à capacitação por conta da possível incubação de

espermatozoides recuperados apresentando membranas espermáticas lesadas, fato citado anteriormente e sugerido após a técnica de Percoll.

Outros estudos confirmaram a eficácia da capacitação pela heparina em espermatozoides de caprinos, em condições parecidas com as do presente estudo. Lv et al. (2009) após submeterem os espermatozoides criopreservados de caprinos à incubação com 50 µg de heparina/mL por 2 horas, avaliaram os efeitos da capacitação espermática após a FIV. Os autores obtiveram altos índices de penetração de oócitos ($56,3 \pm 2,3\%$) e de clivagem embrionária ($51,0 \pm 2,1\%$). Esses resultados validam a utilização da concentração de heparina utilizada e do tempo de incubação para a capacitação no presente estudo.

Aplicando esses conhecimentos ao encontrado neste estudo, sugere-se que a baixa motilidade e aumento da taxa de MP lesada observadas após incubação de todos os grupos experimentais, possivelmente não ocorreu devido ao período de incubação prolongado. Esse aumento na taxa de membranas espermáticas lesadas possivelmente pode estar associada à subpopulação de espermatozoides de baixa qualidade recuperados após a técnica de Percoll, que são mais sensíveis a prolongados intervalos de incubação.

Existem alguns relatos do efeito do ON e das concentrações de NPS sobre os parâmetros espermáticos na espécie bovina, bubalina e humana, mas muitos ainda controversos. Devido ao fato de não haver estudos na literatura sobre a ação do NO na capacitação *in vitro* de espermatozoides de caprinos, os resultados obtidos no presente estudo não podem ser comparados com outros, porém pode-se verificar um paralelismo dos parâmetros com a espécie bovina e bubalina. Entretanto, a interpretação dos resultados encontrados para a espécie caprina deve ser realizada com cautela, uma vez que segundo Leal et al. (2009), espécies distintas provavelmente apresentam respostas diversas devido às diferenças fisiológicas e particulares em relação à sensibilidade a diferentes concentrações de ON. Além disso, os estudos encontrados na literatura apresentam diferentes métodos de preparação espermática e condições de capacitação, o que pode justificar as diferenças nos resultados quando compararmos com o presente experimento.

Muitos estudos constataram que altas concentrações de ON diminuem a motilidade espermática (Tomlinson et al., 1992; Herrero et al., 1994; Zini et al., 1995; Herrero et al., 2001) e a viabilidade espermática (Roselli et al., 1995). Por outro lado,

muitos estudos verificaram que baixas concentrações melhoram a motilidade e a viabilidade espermática (Tomlinson et al., 1992; Hellstrom et al., 1994; Zini et al., 1995; Yeoman et al., 1998; Herrero et al., 1999; Herrero et al., 2001; Leal et al., 2009).

Rodriguez et al. (2005), analisando o efeito de ON na capacitação de sêmen congelado de bovinos, em condições semelhantes ao presente estudo, verificaram que houve diminuição da motilidade para concentrações acima de 400 μM de NPS. Por outro lado, esse parâmetro não foi alterado para as concentrações de 0,05 a 200 μM de NPS em relação ao controle, estando de acordo com os resultados encontrados no presente estudo. Segundo os autores, a queda de motilidade causada por maiores concentrações de ON, se dá pela citotoxicidade espermática provocada pelo efeito inibidor do ON ao se ligar ao grupo heme presente nas enzimas da respiração celular. A ligação do ON nessas proteínas (citocromo *c*-oxidase) resulta num decréscimo da produção de ATP, restringindo a fonte de energia espermática levando a alteração da função mitocondrial. Esses dados sugerem que a motilidade tem efeito dose-resposta. Esse fato pode explicar a ausência do efeito das concentrações de NPS testadas sobre a motilidade no presente estudo, provavelmente por se tratarem de doses insuficientes, visto que não houve diferença ($P > 0,05$) entre a maior dose de NPS utilizada (100 μM – 38,3 \pm 3,5%) e o grupo controle (34 \pm 3,9%).

Há muitos relatos na literatura que comprovam a propriedade de capacitação do ON em várias espécies, não estando de acordo com o observado no presente estudo (De Lamirande e Gagnon, 1995; Zamir et al., 1995; Zini et al., 1995; Leal et al., 2009). Rodriguez et al. (2005) observaram que todas as concentrações de NPS testadas (0,05 μM a 200 μM) aumentaram a taxa de capacitação espermática em bovinos, em relação ao controle ($P < 0,05$). Porém, as menores concentrações (0,05 μM e 0,1 μM) foram responsáveis pelas maiores taxas de capacitação (em torno de 30%) não diferindo do valor obtido pela heparina.

Boccia et al. (2007), após avaliarem o efeito de 10 μM de NPS na capacitação espermática de búfalos, verificou que após 1 hora de incubação, não houve diferença na taxa de reação acrossomal quando comparado com os espermatozoides expostos a heparina (28,5% e 35,3%, respectivamente). Estendendo a incubação para 2 horas, NPS aumentou significativamente a reação

do acrossoma em relação à heparina (60,1% e 44,1%, respectivamente). Quando o tempo de incubação foi prolongado para 3 horas, a diferença de percentual de reação do acrossoma entre NPS e heparina aumenta ainda mais (68,8% e 36,6%, respectivamente). Os autores evidenciaram que a capacitação espermática induzida por NPS é superior a heparina em sêmen congelado de bubalinos. Esses resultados não estão de acordo com o presente estudo, onde não foi observada diferença ($P>0,05$) nas taxas de espermatozoides com MP intacta e acrossoma lesado entre os grupos tratados com NPS, heparina e o controle. O grupo experimental que apresentou a maior concentração de NPS obteve porcentagem semelhante ao grupo controle e ao momento pós descongelamento ($2,9\pm 0,4\%$, $2,5\pm 0,4\%$ e $2,1\pm 0,3\%$, respectivamente).

O NPS apresenta a capacidade de gerar ON instantaneamente (3-10 segundos), enquanto que outros doadores liberam ON durante um período mais longo. Quando o NPS é utilizado como fonte de NO, este dispõe de um curto período de tempo para exercer a sua ação de induzir a capacitação sobre os espermatozoides (Herrero et al., 1999). As baixas taxas de espermatozoides com MP intacta e acrossoma lesado observadas no presente estudo podem ser explicadas pela propriedade de geração de ON e, provavelmente, pelo fato das concentrações de NPS não terem sido suficiente para induzir a capacitação.

Conforme abordado anteriormente, a motilidade e a taxa de integridade de MP não foram diferentes entre o grupo controle e os grupos tratados, sugerindo que as concentrações de NPS utilizadas não foram altas o suficiente para provocar a queda desses parâmetros nos grupos expostos a este. Contudo, Srivastava et al. (2006) afirmaram que quando em baixas concentrações, o ON age como um importante agente antioxidante, evitando que as células sofram lipoperoxidação e perda de integridade. Frente a esta constatação e ainda se baseando na semelhança dos valores da motilidade e da taxa de integridade de MP obtidos em todos os tratamentos, sugere-se que o NPS não causou proteção contra a lipoperoxidação, uma vez que se esperava que o grupo controle, mais exposto a esse evento, apresentasse menor motilidade e maior taxa de MP lesada em relação aos grupos que foram submetidos à proteção antioxidante ocasionada pela liberação de ON (GIII, IV e V). Adicionalmente, o fato de os grupos tratados apresentarem taxas de espermatozoides com MP intacta e acrossoma lesado parecidas com o

grupo controle e com o momento pós descongelamento, levanta a hipótese de que as concentrações de NPS utilizadas foram baixas o suficiente para não causar danos às membranas espermáticas dos espermatozoides, e abaixo da concentração mínima requerida para causar proteção, induzir a capacitação e promover aumento da motilidade.

Alguns estudos encontrados na literatura constataram o poder do ON na hiperativação da motilidade (Burks et al., 1995; Yeoman et al., 1998; Leal et al., 2008). Moran et al. (2008) constataram alterações no movimento espermático após a incubação com o NPS, semelhantes aos que ocorrem na capacitação espermática, estando de acordo com as observações do presente estudo, onde houve aumento do vigor após a incubação com 100 μ M de NPS ($4,7\pm 0,1$), em relação ao grupo controle ($4,2\pm 0,1$) e ao grupo exposto a heparina ($4,3\pm 0,2$). Esses dados diferem dos encontrados por Ferreira-Berbari et al. (2010), que observaram uma antecipação da diminuição do vigor ao longo do intervalo de incubação com NPS de espermatozoides bovinos. Por outro lado, Centola et al. (1998) e Hallap et al. (2004) afirmam que o padrão de movimento aumentado pode indicar grau de crioinjúria para amostras congeladas, uma vez que o processo de criopreservação ocasiona efeitos parecidos com a capacitação.

No presente estudo, houve diferença ($P<0,05$) em relação ao vigor entre o grupo controle ($4,2\pm 0,1$) e o momento pós descongelamento ($3,3\pm 0,1$). Possivelmente este grupo experimental sofreu uma hiperativação por conta das crioinjúrias. Entretanto, houve diferença ($P<0,05$) em relação a este mesmo parâmetro entre o grupo experimental que foi exposto a maior concentração de NPS ($4,7\pm 0,1$) e os grupos controle e o exposto à heparina ($4,3\pm 0,2$). Aplicando esse fato ao conhecimento encontrado na literatura, sugere-se que essa diferença possivelmente se deu pela potencialização da hiperativação devido à exposição ao NPS somada aos efeitos da criopreservação. Esses dados sugerem que, a concentração de 100 μ M de NPS pode ter sido suficiente para promover a hiperativação, apesar de, provavelmente, ter sido insuficiente para induzir a capacitação.

Outro fator que pode ter sido responsável pela evidência do vigor em todos os grupos experimentais, foi o uso da cafeína no presente ensaio. Segundo Márquez e Suarez (2004), a hiperativação espermática pode ser induzida em

espermatozoides não capacitados por agentes como a cafeína. Fato esse que pode levantar a hipótese da ausência de capacitação em todos os grupos tratados, sugerindo que as doses de NPS utilizadas não foram suficientes para tal.

5 CONCLUSÃO

O método de lavagem por centrifugação apresentou melhores resultados quanto aos parâmetros espermáticos e sugere-se que este método pode ser utilizado para seleção espermática de espermatozoides criopreservados de caprinos, desde que o meio de cultura seja substituído por um meio específico e enriquecido para a FIV.

O Percoll recuperou espermatozoides apresentando melhores taxas de motilidade e integridade de MP em relação ao “Swim-up”, apesar da alta força de centrifugação utilizada durante a técnica.

O uso do NPS como doador de ON não alterou a motilidade e possivelmente não provocou danos à integridade de MP das células espermáticas de caprinos, quando em concentrações entre 10 e 100 μM . Sugere-se que o efeito de NPS é dose-resposta e a maior concentração utilizada apresentou melhores parâmetros espermáticos em relação à heparina. Por outro lado, possivelmente, as concentrações testadas de NPS não foram suficientes para induzir a capacitação. Mais estudos utilizando o NPS e o ON durante a capacitação *in vitro* de espermatozoides criopreservados de caprinos devem ser desenvolvidos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A., GUPTA, S., SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, v.3, n.28, 2005.

AITKEN, R.J., CLARSON, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J of Androl*, v.9, n.6, 1988.

AITKEN, R.J., KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, v.122, p.497-506, 2001.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. *Biologia molecular da célula*. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 506p, 1997.

ANDERSEN, C.Y., GRINSTED., A. New method for the purification of human motile spermatozoa applying density-gradient centrifugation: Polysucrose media compared to Percoll media. *J of Assist Reprod and Genet*, v.14, n. 10, 1997.

AREEKIJSEREE, M., VEERAPRADITSIN, T. Characterization of porcine oviductal epithelial cells, cumulus cells and granulosa cells-conditioned media and their ability to induce acrosome reaction on frozen-thawed bovine spermatozoa. *Micron*, v. 39, p. 160-167, 2007.

ARRUDA, R.P., BALI, B.A., GRAVANCE, C.G., LIU, I.K.M. Avaliação dos efeitos diluidores e crioprotetores para espermatozoides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. *Acta Scient Veterin*, v. 31, p. 228-229, 2003.

ARRUDA, R.L., ORRO, I.R., PASSOS, T.S., COSTA E SILVA, E.V., ZÚCCARI, C.E.S.N. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. *Rev Bras Reprod Anim*. Belo Horizonte, v.34, n.3, p.168-184, 2010.

AX, R.L., LENZ, R.W. Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. *J Dairy Sci*, v.70, n. 7, p.1477-1486, 1987.

AZEVEDO, H.C., MACHADO, R., SIMPLÍCIO, A.A., SOARES, A.T. Características do sêmen caprino congelado: influência do tipo de palheta e concentração espermática. *Rev Cient Rur*, v. 2, p. 148- 157, 2000.

BALDASSARRE, H., KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction Technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci*, v.82/83, p.255-266, 2004.

BALDASSARRE, H., WANG, B., KAFIDI, N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenol*, v.57, p.275–284, 2002.

BAUMBER, J., SABEUR, K., VO, A., BALL, B.A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenol*, v.60, p.1239-1247, 2003.

BATISTA, A.M., GUERRA, M.M.P. Novas técnicas para a avaliação da qualidade do sêmen caprino. *Rev Bras Reprod Anim Belo Horizonte*, v.34, n.3, p.125-132, 2010.

BEDFORD, J.M., CHANG, M.C. Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high-speed centrifugation. *Am J Physiol*, v.202, p.179-181, 1962.

BEILBY.K.H.,GRAAF.S.P.,GRUPEN.C.G. The effect of sperm and cryoprotectant on the freezing success of sex sorted ram sperm *in vitro* fertilization. *Theriogenol*, v.74, p.786-794, 2010.

BESENFELDER, U., MOBLAHER, G., BREM, G. Oocyte collection. *Reprod Domest Anim Suppl*, v.6, p.38-44, 1999.

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*, v.25, p.383-391, 1973.

BLONDIN, P., BEAULIEU, M., FOURNIER, V., MORIN, N., CRAWFORD, L., MADAN, P., KING, W.A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenol*, v. 71, p. 30-38, 2009.

BOCCIA, L., ATTANASIO, L., DE ROSA, A., PELLERANO, G., DI PALO, R., GASPARRINI, B. Effect of sodium nitroprusside on buffalo sperm capacitation *in vitro*. *Reprod Fertil and Develop*, v.19, n.1, 276–277, 2007.

BURKS, D., CARBALLEDA, R., MOORE, H.D.M., SALING, P.M. Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with zona pellucida at fertilization. *Scien*,v.269, p.83-86, 1995.

CARNEIRO, G.F., Biotecnologia da reprodução na espécie caprina: perspectivas atuais. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.268-273, 2007.

CARRELL, D.T., KUNECK, P.H., PETERSON, C.M. A randomized, prospective analysis of five sperm preparation techniques before intrauterine insemination of husband sperm. *Fertil Steril*, v.69, p.122-126, 1998.

CARVALHO, J.O., MACHADO, G.M., FRANCO, M.M., RUMPF, R., DODE, M.A.N. Comparison of different techniques to evaluated membrane and acrosome integrity of bovine cryopreserved sperm cells. In: *XXV JUBILEE WORLD BUIATRICS CONGRESS, Budapeste. Anais...Oral and Poster XXV Jubilee World Buiatrics Congress*. n. 905, p. 205, 2008. (Abstract)

CENTOLA, M.C., RITA, H., ANDOLINA, E., WEISENSEL, S. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. *Fertil Steril*, v.70, n.6, 1998.

CHANG, M.C. The meaning of sperm capacitation. A historical perspective. *J Androl*, v.5, n.2, p.45-50, 1984.

CHAUHAN, M.S., ANAND, S.R., *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Indian J Exp Biol*, v. 29, p.105–110, 1991.

CHAVEIRO, A. Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmotic Supports. *Theriogenol*, v.65, p.1875-1890, 2006.

CHEN, M.J., BONGSO, A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Hum Reprod*, v.14, p.759-764, 1999.

COGNIÉ, Y., BARIL, G. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* e *in vitro* chez la debris e la chevre. *Prod Anim*, v.15, p.199-207, 2002.

COGNIÉ, Y., BARIL, G., POULIN, N., MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenol*, v.59, p.171–188, 2003.

COGNIÉ, Y., POULIN, N., LOCATELLI, Y., MERMILLOD, P. State-of-art production, conservation and transfer of *in vitro*-produced embryos in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.437-445, 2004.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2. ed, Belo Horizonte, 49 p, 1998.

COLETO, Z.F., GUERRA, M.M.P., BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. *Rev Bras Med Vet*, v.24, p.101-104, 2002.

CORREA, J.R., ZAVOS, P.M. Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *Theriogenol*, v.46, p. 1225-1232, 1996.

CROZET.N., Manipulation of oocytes and *in vitro* fertilization. *J Reprod Fert Suppl*, v.43, p.235–43, 1991.

DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod Suppl.1*, v.10, p.15-21, 1995.

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

DE LAMIRANDE, E., LAMONTE, G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med*, v.46, p.502-510, 2009.

DE LAMIRANDE, E., LECLERC, P., GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod*, v. 3, n. 3, p.175- 194, 1997b.

DE LAMIRANDE, E., O'FLAHERTY, C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta*, v.1784, n.1, p.106-15, 2008.

DACHEUX, J.L., BELGHAZI, M., LANSON, Y., DACHEUX, F. Human epididymal secretome and proteome. *Mol Cell Endocrinol*, v.250, p.36-42, 2006.

DERIVAUX, J. Reprodução dos animais domésticos. Zaragoza: Editorial Acribia, 446p.1980.

DIDION, B.A., DOBRINSKY, J.R., GILES, J.R., GRAVES, C.N. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gam Res*, v. 22, p. 51-57. 1989.

DODE, M.A.N., RODOVALHO, N.C., UENO, V.G., FERNANDES, C.E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of bos indicus oocytes. *Anim Reprod Scie*, v. 69, p.15–23, 2002.

DOWLING, D.K., SIMMONS, L.W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc R Soc Lond B*, v.276, p.1737-1745, 2009.

DROBNIS, E.Z., ZHONG, C.Q., OVERSTREET, J.W. Separation of cryopreserved human semen using Sephadex columns, washing or Percoll gradients. *J Androl*, v.12, p.201-208, 1991.

ELZANATY, S., ERENPREISS, J., BECKER, C. Seminal plasma albumin: origin and relation to the male reproductive parameters. *Androl*, v.39, p.60-65, 2007.

EVENSON, D.P., JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci*, v.22, p.169–189, 2000.

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). *J Androl*, v.17, p.293-300, 1996.

FERNANDES, C.E., DODE, M.A., PEREIRA, D., SILVA, A.E. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. *Theriogenol*, v.70, p.1560-1568, 2008.

FERREIRA-BERBARI, J.B.P., CALDAS-BUSSIÈRE, M.C., PAES DE CARVALHO, C.S., VIANA, K.S., LEAL, A.C.S.M., QUIRINO, C.R. Effect of inhibition of inducible nitric oxide synthase on *in vitro* capacitation of bovine spermatozoa. *Arq Bras Me. Vet Zootec*, v.62, n.3, p. 511-520, 2010.

FISER, P.S., FAIRFULL, R.W.C. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiol*, v.26, p.64-69, 1989.

FLESCHE, F.M., GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim et Biophys Acta*, v. 114, n. 3, p. 197-235, 2000.

FLESCH F.M., WIJNAND, E., VAN DE LEST, C.H., COLENBRANDER, B., VAN-GOLDE, L.M., GADELLA, B.M. Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. *Mol Reprod Develop*, v. 60, p. 107-115, 2001.

FOLCHINI, N.P., LEIVAS, F.W., SANTOS, F.W., SCHWENGBER, E.B., MARTIN, D.M., SPIAZZI, C.C., BRUM, D.S. Uso de mini-Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.36, n.4, p.239-244, 2012.

FONSECA, J. F., Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2005. Goiânia, GO. Anais: Palestras*

FONSECA, J.F., TORRES C.A.A., MAFFILI, V.V., BORGES, A.M., SANTOS, A.D.F., RODRIGUES, M.T., OLIVEIRA, R.F.M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Anim Reprod*, v.2, n.2, p.139-144, 2005.

FONSECA, J.F., TORRES, C.A.A, SANTOS, A.D.F., ROVAY, H., BORGES, A.M., BARBOSA, L.P., MAFFILI, V.V., FRAGA, D.B.M. The hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. *Rev Bras Reprod Anim*, v.25, p.436-438, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). *Production yearbook*. v.57, 2003.

FRASER, L.R. Interactions between a decapacitation factor and mouse spermatozoa appear to involve fucose residues and a GPI-anchored receptor. *Mol Reprod Desenv*, v.51, p.193-200, 1998.

FRENEAU, G.E. Aspectos da morfologia espermática em touros. *Rev Bras Reprod Anim* Belo Horizonte, v.35, n.2, p.160-170, 2011.

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

FUSE, H., OHTA, S., SAKAMOTO, M., KAZANA, T., KATAYAMA, H. Hypoosmotic swelling test with a medium of distilled water. *Archi Androl*, v.30, p.111-116, 1993.

GADELLA, B.M., RATHI, R., BROUWERS, J.F.H.M., STOUT, T.A., COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim Reprod Sci*, v. 68, n. 4, p. 249-265, 2001.

GARNER, D.L., HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e plasma seminal. *In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal*, 7ed. Manole: São Paulo, p. 97-110, 2004.

GIL, J., SIJDERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H., Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenol*. v.54, p.92-106, 2000.

GONÇALVES, P.B.D., VISINTIN, J.A., OLIVEIRA, M.A.L., MONTANGER, M.M., COSTA, L.F.S. *In: Produção in vitro de embriões. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. Livraria Varela, 1 ed, São Paulo, p.195-226, 2001.

GRAFF, K.J., MEINTJES, M., DYER, V.W., PAUL, J.B., DENNISTON, R.S., ZIOMEK, C., GODKE, R.A. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. *Theriogenol*, v.51, p.1099-1119, 1999.

GRAHAM, J. K., KUNZE, E., HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod*, v.43, n.1, p.55- 64, 1990.

GRAHAM, J.K, MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenol*, v. 64, p. 492-504, 2005.

HAENLEIN, G.F.W. Goat milk in human nutrition. *Small Rum Res*, v.51, p.155–163, 2004.

HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. Reprodução animal. 7.ed. Barueri: Manole, 513 p. 2004.

HALLAP, T., HAARD, M., JAAKMA, U., LARSSON, B., MARTINEZ, H. R. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? *Theriogenol*, v. 62, p. 702-13, 2004.

HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J of Androl*, v. 11, p. 73-88, 1990.

HANCOCK, J.L.A. Staining technique for the study of temperature-shock in semen, *Nature*, v. 24, p. 323-324, 1951.

HANSEN, P.J. Realizing the promise of IVF in cattle – an overview. *Theriogenol*, v.65, p.119-125, 2006.

HARRISON, R.A.P. A highly efficient method for washing mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.48, p.347-353, 1976.

HELLSTRON, W.J.G., BELL, M., WANG, R.Y. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability, and lipid peroxidation. *Fertil Steril*, v.61, p.1117-1122, 1994.

HENKEL, R.R., SCHILL, W.B. Sperm preparation for art. *Reprod Biol Endocrinol*, v.14, n.1, p.108, 2003.

HERRERA, J. Acrosome reaction infertile and subfertile boar sperm. *Arch Androl*, v. 48, p.133-139, 2002.

HERRERO, M.B., CEBRAL, E., BOQUET, M. Effect of nitric oxide on mouse sperm hyperactivation. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*, v.44, p.65-69, 1994.

HERRERO, M.B., DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C. Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation *in vitro*. *Biol of Reprod*, v.61, p.575–581, 1999.

HERRERO, M.B., DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C. Tyrosine nitration in human spermatozoa: a physiological function of peroxynitrite, the reaction product of nitric oxide and superoxide. *Mol Hum Reprod*, v.7, p.913–921, 2001.

HERRERO, M.B, GAGNON, C. Nitric Oxide: A novel mediator review of sperm function. *J of Androl*, v. 22, n. 3, 2001.

HERRICK, J.R., LANE, M., GARDNER, D.K., BEHBOODI, E., MEMELI, E., BLASH, S., ECHELARD, Y., KRISHER, R.L., Metabolism, protein content, and *in vitro* embryonic development of goat cumulus–oocyte complexes matured with physiological concentrations of glucose and L-lactate. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.256–66, 2006.

HINTON, B.T., PALLADINO, M.A., RUDOLPH, D., LABUS, J.C. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod.Fertil. Dev.*, v.7, p.731-745, 1995.

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

HOLT, W.V., HEAD, M.F., NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol Reprod*, v.46, p.1086-1094, 1992.

JANUSKAUSKAS, A., GIL, J., SODERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTÍNEZ. H. Relationship between sperm response to glycosaminoglycans *in vitro* and non returns rates of Swedish dairy AI bulls. *Reprod Dom Anim*, v.35, p.207-212, 2000.

JEYEDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H., PEREZ-PELAEZ, M., CRABO, B.G., ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the

human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J of Reprod Fertil*, v. 70, p. 219-228, 1984.

JOHNSON, L., BLANCHARD, T.L., VARNER, D.D., SCRUTCHFIELD, W.L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenol*, v.48, p.1199-1216, 1997.

KHALIFA, A.A., EL-SAIDY, B. pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender. *Anim Reprod Scie*, v.93, p.303–315, 2006.

KIM, L.H., VAN LANGENDONCKT, A. VAN SOOM, A., VANROOSE, G., CASI, A.L., HEDRIKSEN, P.J.M., BEVERS, M.M. Effect of exogenous glutathione on the *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenol*, v.52, p.537–547, 1999.

KITIYANANT, Y., CHAISALEE, B., PAVASUTHIPAISIT, K. Evaluation of the acrossome reaction and viability in buffalo spermatozoa using two staining methods: the effects of heparin and calcium ionophore A23187. *Int J Androl*, v.25, p.215-222, 2002.

KOEMAN, J., KEEFER, C.L., BALDASSARRE, H., DOWNEY, B.R. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenol*, v.60, p.879-889, 2003.

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *J Memb Biol*, v.165, p.1-10, 1998.

LAPOINTE, S., SIRARD, M.A. Importance of calcium for the binding of oviductal fluid proteins to the membranes of bovine spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, v.44, n.2, p.234-40, 1996.

LEAL, A.C.M.S., CALDAS-BUSSIÈRE, M.C., PAES DE CARVALHO, C.S., VIANA, K.S., QUIRINO, C.R. Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced *in vitro*. *Anim Reprod Scie*, v.116, p.38–49, 2009.

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

LIHUA, L.V., WENBIN, Y.U.E., WENZHONG, L.I.U., YOUSHE, R.E.N., FUZHONG, L.I., KYUNG-BON, L.E.E., GEORGE, W.S., ANIM, J. Effects of sperm pretreatments and in vitro culture systems on development of in vitro fertilized embryos derived from prepubertal boer goat oocytes in china. *Science*, v.22, n.7, p.969-976, 2009.

LIU, D.Y., BAKER, H.W. Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil Steril*, v.58, p.465–483, 1992.

LONERGAN, P., Fair, T. *In-vitro* produced embryo-Dealing with the warts. *Theriogenol*, v.69, p.17-22, 2008.

LOPES, M.D., PAPA, F.O. Effects of different diluents and method of centrifugation for freeze canine semen *In: CONGRESS OF THE WORDL SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 23., 1998, Buenos Aires. Proceedings... Buenos Aires, 1998. p.799.*

LUKOSEVICIUTE, K., ZILINSKAS, H., JANUSKAUSKAS, A.A. The effect of oestradiol, progesterone and heparin on bovine spermatozoa function after thawing. *Reprod Dom Anim*, v. 40, n.2, p. 100-107, 2005.

LV, L., YUE, W., LIU, W., REN, Y., LI, F., LEE, K.B., SMITH, G.W. Effects of sperm pretreatments and in vitro culture systems on development of in vitro fertilized embryos derived from prepubertal boer goat oocytes in china. *Asian-Aut J Anim Sci*, v.22, n.7, p.969-976, 2009.

MAIA, M.S., BICUDO, S.D., Radicais livres, antioxidants e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, 2009.

MALIK, R.K., LOHAN, I.S., DHANDA, O.P., TULI, R.K. Test for the acrosomal reaction of goat spermatozoa treated with heparin. *Small Rumi Res*, v.26, p.163-166, 1997.

MANELLA C.A. Introduction: our changing views of mitochondria. *J of Bioen Biomem*, v. 32, p.1-4, 2000.

MARCO-JIMÉNEZ, F., BALASCH, S., VICENTE, J.S., LAVARA, R., CASTRO, M.P., MOCÉ, E. Detection of sub-fertile rabbits by means of sperm head morphometry analysis. *J Androl Suppl*, p.80, 2005.

MARCO-JIMÉNEZ, F., CASTRO, V.M.P., BALASCH, S., MOCÉ, E., SILVESTRE, M.A., GOMEZ, E.A., VICENTE, J.S. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobio*, v.52, p.295-304, 2006.

MARQUEZ, B., SUAREZ, S.S. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biol Reprod*, v.70, p.1626-1633, 2004.

MAXWEL, W.M.C.O., JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa of a dilution rates : the influence of seminal plasma. *Theriogenol*, v.52, p.1273-80, 1999.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J of Physiol*, v.247, n.16, p.125-142, 1985.

MELO, M.I.V., HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. *Arq Bras Vet Zoot*, v.51, n.1, p.71-78, 1999.

MORAES, C.N., NEVES, J.P., GONÇALVES, P.B.D., OLIVEIRA, J.F.C., SCHWEITZER, C.M. Criopreservação do sêmen ovino em pellets com etileno glicol. *Ciênc Rur*, v.28, p.287-292, 1998.

MAAS, D.H.A., STOREY, B.T., MASTROIANNI, L. Oxygen tension in the oviduct of the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril*, v.27, p.1312–1318, 1976.

MARTINS, C.F., DODE, M.A.N., BÁO, S.N., RUMPF, R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Gen Mol Res*, v.6, p.94-104, 2007.

MEHMOOH, A., ANWAR, M., SAGLAN, S.M. Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by Swim-up or Percoll gradient method from frozen–thawed buffalo semen. *Anim Reprod Scie.* v.111, p.141–148, 2009.

MORAN, J.M., MADEJON, N., ORTEGA FERRUSOLA, C., PEÑA, F.J. Nitric oxide induces caspase activity in boar spermatozoa. *Theriogenol*, v.70, p.91–96, 2008.

MORTIMER, D. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod Fertil Dev*, v.6, p.25-31, 1994.

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

NAYAR, K.D., SEHGAL, P., TIWARI, A., STERILITY. Comparative study of various semen preparation techniques in IUI and their effect on pregnancy rate. *Fertil Steril*, v.86, p.S502-S503, 2006.

NEVES, J.P., BLAYA, M.C.R., TEIXEIRA, P.R. Efeitos da concentração espermática na dose de sêmen ovino congelado em minitubos. *A Hora Vet*, v.14, p.11-14, 1983.

NG, F.L.H., LIU, D.Y., BAKER, H.W.G. Comparison of Percoll, mini-Percoll and Swim-up methods for spermatozoa preparation from abnormal semen samples. *Human Reprod*, v.7, p.261- 266, 1992.

O'FLAHERTY, C., BEORLEGUI, N., BECONI, M.T. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. *Int J Androl*, v.26, p.109-114, 2003.

O'FLAHERTY, C., BEORLEGUI, N., BECONI, M.T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenol*, v.52, p.289–301, 1999.

PAES DE CARVALHO, C. S., CALDAS-BUSSIÈRE, M. C., CARVALHO, F. P. Efeito do óxido nítrico na capacitação *in vitro* induzida ou não pela heparina em espermatozoides bovinos. *Acta Sci Vet*, v.31, p.516, 2003.

PALMA, G.A., TORTONESE, D.J., SINOWATZ, F. Developmental capacity *in vitro* of prepubertal oocytes. *Anat Histol Embryol*, v. 30, p. 295-300, 2001.

PALOMO, M.J., IZQUIERDO, D., MOGAS, T., PARAMIO, M.T. Effect of semen preparation on FIV of prepubertal goat oocytes. *Theriogenol*, v.51, p.927-940, 1999.

PALOMO, M.J., MOGAS, T., IZQUIERDO, D., PARAMIO, M.T. The influence of sperm concentration, length of the gamete co-culture and the evolution of different sperm parameters on the *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote* p.345–355, 2010.

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

PARKS, J., HAMMERSTEDT, R.H. Developmental changes occurring in the Lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol Reprod*, v.32, p.653–668, 1985.

PARRISH, J.J., FOOTE, R.H. Quantification of bovine sperm separation by Swim-up method –relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. *J of Androl*, v.8, p.259-266, 1987.

PARRISH, J.J., KROGENAES, A., SUSKO-PARRISH, J.L., Effect of bovine sperm separation by either Swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenol*, v.44, p.859-869, 1995.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., HANDROW, R.H. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod*, v.40, n. 5, p.1020-1025, 1989.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., WINER, M.A., FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*, v. 38, n. 5, p. 1171-1180, 1988.

PAULA, N.R.O., CARDOSO, J.F., OLIVEIRA, M.A.L., FREITAS, V.J.F. Embriões caprinos produzidos *in vivo* ou *in vitro*: técnicas, problemas e perspectivas. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.32, n.1, p.21-35, 2008.

PEREIRA, R.J.T.A., RUN, R.K., TULI, R.K., WALLENHORST, S., HOLTZ, W. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A 23187 on *in vitro* induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenol*, v. 54, n. 2, p.185-192, 2000.

PEREZ, L.J., VALCARCEL, A., HERAS, M.A., MOSES, D., BALDASARRE, H. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation *in vitro* as assessed by *Chlortetracycline* assay. *Theriogenol*, v.46, p.131-140, 1996.

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

PETERSON, K., KAPPEN, M.A.P.M., URSEM, P.J.F., NOTHLING, J.O., COLENBRANDER, B., GADELLA, B.M. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenol*, v.67, p.863-871, 2007.

RASUL, Z., AHMAD, N., ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *Am Society of Androl*, v. 22, n. 2, p. 278-284, 2001.

RHO, G.J., HAHNEL, A.C., BETTERIDGE, K.J. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. *Theriogenol*, v.56, p.503-516, 2001.

RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we increase the estimated value of semen assessment? *Reprod Dom Anim*, v. 4, p. 1415-1420, 2006.

RODRIGUEZ-MARTÍNEZ. H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia. *Reprod Dom Anim*, v.38, p.312-318, 2003.

RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H., LARSSON, B., PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod Fertil Devel*, p.297–308, 1997.

RODRIGUEZ, P.C., O'FLAHERTY, C.M., BECONI, M.T., BEORLEGUI, N.B. Nitric oxide-induced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. *Anim Reprod Scie*, v.85, p.231–242, 2005.

ROSENKRANZ, C., HOLZMANN, A. The effect of sperm preparation on the timing of penetration in bovine in vitro fertilization. *Anim Reprod Scie*, v.46, p.47–53, 1997.

ROSSELLI, M., DUBEY, R.K., IMTHURN, B. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Hum Reprod*, v.10, p.1786-1790, 1995.

SAACKE, R.G., NADIR, R.L., NEBEL, J.H. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. *Theriogenol*, v. 41, p. 45-60, 1990.

SAEKI, K., NAGAO, Y., HOSHI, M. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on *in vitro* fertilization of bovine oocytes in protein-free medium. *Theriogenol*, v.44, p.859-869, 1995.

SAHNI, K.L., MOHAN, G. Yolk as a cryoprotectant in deep-freezing of bovine semen. *Indian J Anim Sci*, v.60, p.828–829, 1990.

SHAMSUDDIN, M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. A simple, non-traumatic Swim-up method for the selection of spermatozoa for *in vitro* fertilization in the bovine. *Anim Reprod Scie*, v.36, p.61-75, 1994.

SHONECK, C., BRAUN, J., EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced *in vitro* by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenol*, v. 45, p. 633-642, 1996.

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

SINGER, S.J, NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes. *Science*. v.75, n. 4023, p. 720- 731, 1972.

SINGH, J., PANGAWKAR, G.R., BISWAS, R.K., KUMAR, N. Studies on buffalo sperm morphology during various stages of freezing in certain extenders. *Indian J Anim Reprod*, v.12, p.126–129, 1991.

SOMFAI, T., Effect of swim up and percoll treatment on viability and acrossome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Dom Anim*, v.37, p.285-290, 2002.

SRIVASTAVA, S., DESAI, P., COUTINHO, E., GOVIL, G. Mechanism of action of L-arginine on the vitality of spermatozoa is primarily through increased biosynthesis of nitric oxide. *Biol Reprod*, v.74, p.954–958, 2006.

STOJANOV, T., ROBINSON, S. J., RHODES, S. L., O'BRIEN, J. K., EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. *In vitro* fertilisation with chilled-stored ram spermatozoa. *Theriogenol*, v.41, p.302, 1994.

STREHLER, E., BACCETTI, B., STERZIK, K. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa. *Hum Reprod*, v.13, p.120-123, 1998.

SUAREZ, S.S., DAI, X. Intracellular calcium reaches different levels of elevation in hyperactivated and acrosome reacted hamster sperm. *Mol Reprod Dev*, v.42, p.325–333, 1995.

SUAREZ, S.S., VAROSI, S.M., Dai, X. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci*, v.90, p.4660–4664, 1993.

SUTOVSKY, P., OKO, R., HEWITSON, L., SCHATTEN, G. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Dev Biology*, v. 188, p. 75-84, 1997.

SUTTIYOTIN, P., THWAITES, C.J., The ability of trypan blue to differentiate live and dead ram spermatozoa. *Anim Reprod Scie*, v.25, p.209-224, 1991.

SUZUKI, K., GESHI, M., YAMAUCHI, N., NAGAI, T. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black Bull spermatozoa separated by Percoll. *Anim Reprod Scie*, v.77, p.157-172, 2003.

TALBOT, P., CHACON, R.S. A triple-stain technique for evaluating normal acrossome reactions of human sperm. *J Exp Zool*, v.215, p.201-208, 1981.

TANGHE, S., VAN SOOM, A., MAES, D., DE KRUIF, A. Assessment of different sperm quality parameters to predict in vitro fertility of bulls. *Reprod Dom Anim*, v. 37, p.127-132, 2002.

TARTAGLIONE, C.M., RITA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen- thawed bull semen. *Theriogenol*, v. 62, n.7, p. 1245-1252, 2004.

TEA, N. T., JONDET, M., SCHOLLER, R. A migration- gravity sedimentation method for collection motile spermatozoa from human semen. *In: In Vitro Fertilization, Embryo Transfer and Early Pregnancy*, 1984.

TERVIT, H.R. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim Reprod Scie*, v.42, p.227-238, 1996.

THÉRIEN, I., MOREAU, R., MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod*, v.59, p.768-776, 1998.

THIBAUT, C., LEVASSEUR, M.C. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ed. Ellipses: INRA, 720 p, 1992.

THOMAS, A.D., MEYERS, S.A, BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenol*, v.65, n.8, p.1531-1550, 2006.

TOMLINSON, M. J., EAST, S. J., BARRAT, C. L., BOLTON, C. L., COOKE, I. D. Possible role of reactive nitrogen intermediates in leukocytemediated sperm dysfunction. *Am J Reprod Immunol*, v.27, p.89–92, 1992.

VALCÁRCEL, A., DE LAS FERAS, M.A., PÉREZ, L., MOSES, D.F., BALDASSARRE, H. Assessment of the acrosomal status of membrane intact ram spermatozoa after freezing and thawing by simultaneous lectin/Hoechst 33358 staining. *Anim Reprod Scie*, v. 45, p. 299-309, 1997.

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

VILLEGAS, J., KEHR, K., SOTO, L., HENKEL, R., MISKA, W., SÁNCHEZ, R. Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. *Androl*, v.35, p.227-232, 2003.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. The Physiology of Reproduction. 2 ed. New York, p. 189-317, 1994.

YANAGIMACHI, R. Sperm capacitation and gamete interaction. *J of Reprod Fertil Suppl*, Cambridge, Inglaterra, v. 38, p. 27-33, 1989.

YANG, X., JIANG, S., FOOTE, R.H. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Mol Reprod Devel*, v.34, n.1, p.94-100, 1993.

YEOMAN, R.R., JONES, W.D., RIZK, B.M. Evidence for nitric oxide regulation of hamster sperm hyperactivation. *J of Androl*, v. 19, n.1, 1998.

WASSARMAN, P.M., JOVINE, L., LITSCHER, E.S. A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol*, v. 3, p. 59-63, 2001.

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

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

WILSON, H.R., WARNICK, A.C., GUTIERREZ, J.H. Differentiation of live from dead spermatozoa in cock semen. *Poultry Scie*, v. 48, p. 714-717, 1969.

ZAMIR, N., BARKAN, D., KEYNAN, N. Atrial natriuretic peptide induce acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am J Physiol*, v.269, p.216-221, 1995.

ZINI, A., DE LAMIRADE, E., GAGNON, G. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation *in vitro*. *J of Androl*, v.16, n.5, 1995.

ZHANG, B.R., LARSSON, B., LUNDEHEIM, N., HAARD, M.G., RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an IA-programe. *Int J Androl*, v.22, p.253-260, 1999.

ZHOU, J. B., WU, Y.G., LIU, L.Q., LUO, M.J., CHANG, Z.L., TAN, X.W., LIU, N., TAN, J.H. Studies on in vitro capacitation of goat spermatozoa by heparin treatment. *Sh Wu Go Ch Xue Bao*, v.20, n.2, p.252-6, 2004. (Abstract)

ZÚCCARI, C.E.S.N., CARRIJO, P.R., LEITE, P.A., SCALDELA, P.R.R., RODOVALHO, N.C.M., ZANENGA, C.A., KIEFER, C., SILVA, E.V.C. Seleção em gradiente de Percoll sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. *Rev Bras Saúde Prod An*, v.9, n.2, p. 358-366, 2008.

7 APÊNDICES

7.1 APÊNDICE A

Tabela 7. Efeito da interação entre animal e seleção sobre os valores espermáticos antes e após o procedimento de seleção e taxa de recuperação espermática de diferentes machos caprinos da raça Saanen (média ± erro padrão)

Bode	Rep*	Antes da seleção			Após a seleção			Taxa de recuperação espermática (%)
		Concentração (x10 ⁶ / mL)	Motil. (%)	Vigor (1-5)	Concentração (x10 ⁶ / mL)	Motil. (%)	Vigor (1-5)	
A	9	192,5±36,8 ^{a,b,c}	50,0±2,8 ^{a,b}	3,6±0,18	35,9±9,9 ^{b,c}	48,8±3,8	4,3±0,18	19,2±7,5
B	9	218,7±43,3 ^{a,b}	57,7±3,6 ^{a,b}	3,7±0,16	67,5±20,6 ^a	40,0±7,6	4,2±0,32	29,9±12,1
C	9	126,8±19,4 ^{b,c,d}	48,8±4,5 ^{a,b}	3,2±0,23	25,7±7,1 ^{b,c}	56,6±7,2	4,2±0,12	22,5±7,4
D	9	255,9±52,0 ^a	45,5±4,1 ^b	3,3±0,14	51,7±16,0 ^{a,b}	43,3±6,0	4,0±0,29	23,3±6,6
E	9	185,4±18,6 ^{a,b,c}	56,6±3,3 ^{a,b}	3,4±0,15	31,9±8,2 ^{b,c}	54,4±4,7	4,1±0,11	32,7±6,0
F	8	63,7±7,2 ^d	61,1±4,2 ^{a,b}	3,5±0,16	12,6±3,7 ^c	45,0±9,6	4,1±0,15	21,4±7,4
G	9	96,9±11,7 ^{c,d}	54,4±4,4 ^{a,b}	3,0±0,17	30,1±8,2 ^{b,c}	60,0±0,1	4,2±0,14	35,2±9,8
H	9	102,3±8,1 ^{c,d}	47,7±3,6 ^{a,b}	3,2±0,14	26,5±7,0 ^{b,c}	37,7±7,4	3,7±0,30	26,2±7,7
I	9	101,3±8,2 ^{c,d}	65,5±4,4 ^a	3,7±0,14	23,9±6,3 ^{b,c}	56,6±6,0	4,0±0,18	24,5±6,7

^{a,b,c,d} médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05), pelo teste de Student Newman

Keuls.

*número de repetições para cada bode

7.2 APÊNDICE B

Tabela 8. Valores espermáticos obtidos após a realização de três procedimentos de centrifugação de diferentes machos caprinos da raça Saanen (média ± erro padrão)

Bode	Rep*	Centrifugação 1		Centrifugação 2			Centrifugação 3	
		Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Concentração (x10 ⁶ / mL)	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Motilidade (%)	Vigor (1-5)
A	3	73,3±3,3	4,5±0,0	50,0±18,9	73,3±3,3	4,7±0,2	70,0±5,8	4,7±0,2 ^a
B	3	63,3±6,7	4,5±0,0	43,3±18,3	60,0±10,0	4,3±0,2	53,3±12,0	4,3±0,2 ^{b,c}
C	3	63,3±6,7	4,2±0,2	41,7±16,9	60,0±10,0	4,2±0,2	40,0±10,0	4,0±0,0 ^d
D	3	76,7±3,3	4,5±0,0	26,7±8,3	73,3±6,7	4,5±0,0	66,7±8,8	4,5±0,0 ^{a,b}
E	3	66,7±3,3	4,3±0,2	28,3±6,0	70,0±5,7	4,7±0,2	60,0±11,5	4,5±0,0 ^{a,b}
F	3	76,7±3,3	4,3±0,2	43,3±18,6	73,3±3,3	4,5±0,0	66,7±3,3	4,5±0,0 ^{a,b}
G	3	70,0±5,8	4,0±0,3	28,3±14,5	70,0±0,0	4,3±0,2	61,7±6,0	4,2±0,2 ^{c,d}
Total	21	70,0±9,0	4,3±0,3	37,4±23,74	68,6±11,1	4,4±0,3	60,0±16,2	4,4±0,3

^{a,b,c,d} médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05), pelo teste de Student Newman

Keuls.

*número de repetições para cada bode

7.3 APÊNDICE C

Tabela 9. Efeito da interação entre animal e indução da capacitação sobre os parâmetros espermáticos, integridade de membranas plasmática e acrossomal de diferentes machos caprinos da raça Saanen (média ± erro padrão)

Bode	Rep*	Motilidade Pós-incubação (%)	Vigor Pós-inc. (1-5)	Sptz com membrana plasmática intacta (%)		Sptz com membrana plasmática lesada (%)	
				Acrossoma intacto	Acrossoma lesado	Acrossoma intacto	Acrossoma lesado
A	15	38,6±4,9 ^{a,b}	4,1±0,2 ^c	23,5±3,8 ^a	2,9±0,5 ^{a,b}	16,8±1,8 ^c	56,8±4,8 ^b
B	15	27,7±3,1 ^{c,d}	4,5±0,5 ^{a,b}	12,8±6,0 ^b	2,0±0,0 ^{b,c}	24,6±2,0 ^{a,b}	62,1±1,6 ^b
C	15	21,3±3,3 ^d	4,2±0,1 ^{b,c}	12,74±2,6 ^b	4,1±0,2 ^a	7,5±3,2 ^d	75,5±3,3 ^a
D	15	36,0±5,0 ^{a,b,c}	4,2±0,7 ^{b,c}	22,9±4,8 ^a	2,4±0,4 ^{b,c}	29,2±1,0 ^a	45,5±1,1 ^c
E	15	38,7±2,1 ^{a,b}	4,6±0,4 ^{a,b}	22,53±4,3 ^a	3,9±0,7 ^a	29,4±1,6 ^a	44,2±31,3 ^c
F	15	44,7±3,5 ^a	4,8±0,1 ^a	22,5±6,7 ^a	3,2±0,1 ^{a,b}	20,1±0,1 ^{b,c}	53,4±0,1 ^{b,c}
G	15	32,3±3,3 ^{b,c}	4,5±0,4 ^{a,b}	17,9±3,9 ^{a,b}	1,4±0,0 ^c	20,1±4,1 ^{b,c}	27,2±5,2 ^d

^{a,b,c,d} médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05), pelo teste de Student Newman Keuls.

*número de repetições para cada bode

8 ANEXOS

8.1 ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFF





Serviço Público Federal
Universidade Federal Fluminense
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comitê de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto nº 159, intitulado “Estabelecimento de protocolo base para a fertilização *in vitro* em caprinos” sob a orientação do Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão, da Faculdade de Medicina Veterinária, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em 17 de maio de 2012.

Niterói, 9 de fevereiro de 2012.


Presidente da C.E.U.A.

8.2 ANEXO B – PREPARO DE MEIO TALP HEPES (TYRODE'S ALBUMIN-LACTATE-PYRUVATE)

Solução 1 – Solução de Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

Fosfato de sódio monobásico _____ 0,275 g
Água tridestilada _____ 10 mL

Manter congelado por até 3 meses
Alíquotas de 800 μL

Solução 2 – Solução de Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Cloreto de magnésio _____ 0,8 g
Água tridestilada _____ 10 mL

Manter a 4° C por até 3 meses
Alíquotas de 600 μL

Solução 3 – Solução de Vermelho de fenol 1%

Vermelho de fenol _____ 0,1 g
Água tridestilada _____ 10 mL

Manter a 4° C
Alíquotas de 10 mL

Solução 4 – Solução antibiótica

Penicilina 250.000 UI _____ 0,15g
Estreptomicina _____ 0,25 g
Água tridestilada _____ 5 mL

Alíquotas de 100 μL
Manter congelado por tempo indeterminado

Solução 5 – Solução de Piruvato de sódio

Piruvato de sódio _____ 0,011 g
Água tridestilada _____ 5 mL

Manter congelado por até 2 semanas
Alíquotas de 800 μL

Solução Estoque

NaCl _____ 1,8262 g
KCl _____ 0,0596 g

Lactato de sódio 60%	467 µL
NaHCO ₃	0,042 g
Hepes	0,5975 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0735 g
Solução 1	500 µL
Solução 2	317,5 µL
Solução 3	250 µL
Água tridestilada	250 mL

Corrigir o pH para 7,3 – 7,4

Filtrar em filtro de 0,2 µM de poro

Acondicionar em frascos e manter a 4° C por até 2 semanas

Solução de trabalho

Albumina sérica bovina – fração V	0,15 g (3mg/mL)
Solução 4	50µL
Solução 5	500µL
Solução Estoque	50 mL

Corrigir o pH para 7,4 -7,5

Filtrar em filtro de 0,2µM de poro

Preparar diariamente

8.3 ANEXO C – PREPARO DE MEIO SPTL

Solução Estoque

NaCl	0,292 g
KCl	0,0119 g
Lactato de sódio 60%	184,6 µL
NaHCO ₃	0,105 g
Cafeína	0,005 g
Hepes	0,1191 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0147 g
Solução 1 (Anexo B)	100 µL
Solução 2 (Anexo B)	135 µL
Solução 3 (Anexo B)	50 µL
Água tridestilada	50 mL

Corrigir o pH para 7,3 – 7,4

Filtrar em filtro de 0,2 µM de poro

Acondicionar em frascos e manter a 4° C por até 2 semanas

Solução de trabalho

Albumina sérica bovina – fração V	0,06 g (6mg/mL)
Solução 4 (Anexo B)	10µL

Solução 5 (Anexo B) _____ 500µL
Solução Estoque _____ 10 mL

Corrigir o pH para 7,4 -7,5
Filtrar em filtro de 0,2µM de poro
Preparar diariamente

8.4 ANEXO D - PREPARO AZUL TRIPAN 0,4%

Solução NaCl 0,81%

NaCl _____ 0,81 g
Água destilada _____ 100 mL

Manter a 4° C

Solução Estoque

Azul tripan _____ 0,02 g
Solução NaCl 0,81% _____ 5 mL

Filtrar e manter a 4° C por até 2 semanas

8.5 ANEXO E – PREPARO GIEMSA

Solução Estoque

Giemsa _____ 0,75 g
Glicerina _____ 35 mL
Álcool metílico _____ 65 mL

Homogeneizar, filtrar e manter em temperatura ambiente

Solução de trabalho – Giemsa 10%

Solução estoque _____ 1 mL
Água destilada _____ 9 mL

Preparar diariamente e filtrar