

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Efeito da Inibição da Fosfolipase C pelo U73122 Sobre o Sêmen Ovino**

**Aline Matos Arrais**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA FOSFOLIPASE C PELO U73122 SOBRE O  
SÊMEN OVINO**

**ALINE MATOS ARRAIS**

*Sob a orientação do Professor*  
**Marco Roberto Bourg de Mello**

*Sob a coorientação do Professor*  
**Ângelo José Burla Dias**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Ciência Clínicas.

Seropédica, RJ  
Agosto de 2016

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A773e Arrais, Aline Matos, 1990-  
Efeito da Inibição da Fosfolipase C pelo U73122  
Sobre o Sêmen Ovino / Aline Matos Arrais. - 2016.  
62 f.: il.

Orientador: Marco Roberto Bourg Mello.  
Coorientador: Angelo José Burla Dias.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em  
Medicina Veterinária, 2016.

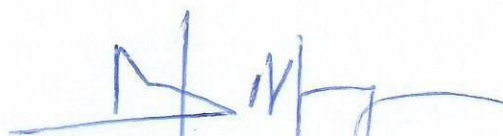
1. espermatozoides. 2. congelamento. 3. carneiro.  
I. Mello, Marco Roberto Bourg , 1971-, orient. II.  
Dias, Angelo José Burla, 1963-, coorient. III  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária. IV.  
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ALINE MATOS ARRAIS

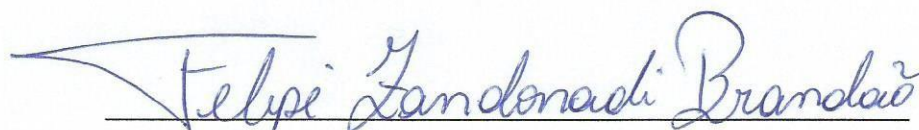
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/08/2016.



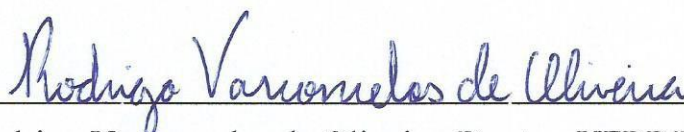
---

Marco Roberto Bourg de Mello. Doutor. UFRRJ  
(Orientador)



---

Felipe Zandonadi Brandão. Doutor. UFF



---

Rodrigo Vasconcelos de Oliveira. Doutor. UFRRJ

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”*  
*(Arthur Schopenhauer)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos recebidas, por direcionar minhas escolhas e por me fazer sentir sua presença ainda que eu estivesse distante.

A toda minha família, em especial ao meu irmão Alison Arrais e aos meus pais Wanda Arrais e Auelino Arrais. Agradeço pelo amor incondicional, e por sempre acreditarem e investirem nos meus sonhos.

Ao meu orientador Dr Marco Roberto Bourg de Mello pela amizade, paciência e dedicação com que me tratou durante esses dois anos de mestrado, e ao meu coorientador Dr Angelo José Burla Dias, que dessa mesma forma, está presente em minha vida há nove anos, contribuindo e se dedicando a minha formação. Obrigada, tenho sorte em tê-los nesta minha caminhada.

Ao professor Dr Cláudio Mello, da Universidade Estadual do Norte Fluminense pela dedicação na realização das análises estatísticas deste trabalho, e por me receber sempre com muito carinho e atenção, mesmo passando por problemas pessoais. Muito obrigada.

Ao professor Dr Felipe Zandonadi Brandão da Universidade Federal Fluminense, por abrir as portas de seu laboratório e disponibilizar suas alunas Carolina Olivares e Luana Côrtes que me ajudaram em etapas importantes deste trabalho. Agradeço muito a disponibilidade e atenção.

A todos do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial aos professores Vera Lúcia Teixeira de Jesus, José Eugênio Três e Júlio César Ferraz Jacob, pelo apoio e incentivo, ao funcionário Zico pelos valiosos conselhos, e ao aluno Jhonnatha Oliveira pela sua fidelidade e companheirismo.

Agradeço a todos do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense, em especial aos técnicos Fausto Carvalho, Carla Paes de Carvalho, Bruna Dias, ao doutorando Valter Maciel Júnior, ao estagiário Jesús Eduardo Jimenez, e a funcionária Ana Rocha da Silva que me ajudaram de maneira direta, ou indiretamente no desenvolvimento do meu experimento.

Agradeço as minhas amigas de república Camilla Portela, Graziela Siqueira, Natália Torres, Luanna Oliveira, em especial minha amiga Thaísa Capato que me atura há onze anos. A vocês agradeço pela amizade, carinho e amor, vocês se tornaram parte da minha família e me ajudaram a lidar com as saudades de casa.

A todas as moradoras do alojamento Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial minha companheira de quarto, Raquel Mello que me recebeu de braços abertos, se tornou uma grande amiga e, para mim um exemplo de determinação.

Ao meu mais que amigo Nardele Rohem por estar sempre ao meu lado me ajudando e apoiando minhas decisões. Obrigada

Agradeço aos amigos Fernanda Brasil, que me concedeu o privilégio de ser “titia” de Maria, a amiga July Navaez, Ivana de Almeida, Gustavo Lunga. Vocês enriqueceram meus dias.

## RESUMO

ARRAIS, Aline Matos. **Efeito da Inibição da Fosfolipase C pelo U73122 Sobre o Sêmen Ovino**. 2016. 54p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do U73122 sobre a congelabilidade do sêmen ovino, uma vez que este reagente pode evitar a capacitação prematura e reação acrossomal induzidas durante o processo de criopreservação. Para isso, ejaculados de quatro carneiros da raça Santa Inês foram obtidos com auxílio de vagina artificial. No ensaio I, espermatozoides de quatro ejaculados, *in natura*, foram submetidos à incubação de 4h a 37°C, suplementados ou não com as concentrações de 10, 20 ou 30µM do U73122, na presença ou ausência do glicerol. Parâmetros cinéticos foram avaliados ao decorrer da incubação, a fim de verificar o comportamento dos espermatozoides pelo uso do reagente, e selecionar doses a serem utilizadas durante a criopreservação. Dezesesseis ejaculados foram utilizados no ensaio II, os quais foram criopreservados com diluentes Botubov® fração única, acrescidos ou não do reagente U73122 nas concentrações de 10 e 20µM. As amostras descongeladas foram avaliadas quanto à cinética espermática, pelo sistema “*Computer Assisted Sperm Analysis*” (CASA), e quanto à integridade de membranas pela associação de sondas fluorescentes iodeto de propídeo, PSA-FITC e JC-1. Adicionalmente, foram realizadas avaliações da capacitação espermática e reação acrossomal com o uso da sonda fluorescente hidrocloreto de clortetraciclina (CTC) antes e após as amostras de sêmen criopreservadas serem submetidas à indução da capacitação *in vitro* durante 4h de incubação a 37°C. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância e ao teste de diferença mínima significativa (DMS) de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O tratamento dos espermatozoides *in natura* com diferentes concentrações do U73122, durante incubação de 4h a 37°C, revelou um efeito dose e tempo-dependente sobre a utilização deste reagente em espermatozoides. Além disso, a presença do glicerol potencializou o efeito tóxico do U73122 sobre as células. Nos espermatozoides criopreservados, o U73122 não afetou nenhum dos parâmetros cinéticos avaliados pelo sistema CASA, nem o número dos espermatozoides com as membranas plasmáticas, acrossomais e mitocondriais íntegras (PIAIC) ou lesadas (PLALS). As avaliações realizadas imediatamente após o descongelamento mostraram que a utilização de 10 ou 20µM do inibidor reduziu o percentual de espermatozoides capacitados e com acrossoma reagido em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Após a indução da capacitação *in vitro*, houve uma redução ( $p < 0,05$ ) do número de espermatozoides não capacitados em todos os tratamentos sugerindo um efeito reversível do U73122 sobre os processos de capacitação espermática e reação acrossomal. Conclui-se que o uso de 10 µM do reagente U73122 não altera a cinética dos espermatozoides *in natura*, e que, concentrações de 10 ou 20 µM deste reagente podem ser utilizadas em diluentes para criopreservação, uma vez que previnem a capacitação prematura e reação acrossomal induzidas durante este processo, sem alterar a cinética e a integridade das membranas espermáticas.

**Palavras-chave:** espermatozoides, congelamento, carneiro.

## ABSTRACT

ARRAIS, Aline Matos. **Effect of U73122 inhibitor on freezing ability of ram semen**. 2016. 54p. Dissertation (Master of Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

The aim of this study was to evaluate the effect of U73122 on freezing ability of ram semen, since this reagent could prevent premature capacitation and acrosome reaction induced during the cryopreservation process. For this, ejaculates from 4 Santa Ines rams were obtained with the aid of artificial vagina and were used in two experiments. In experiment I, *in natura* sperm from 4 ejaculated were subjected to incubation at 37°C during 4h, supplemented or not with concentrations of 10, 20 or 30µM of U73122 in the presence or absence of glycerol. Kinetic parameters were evaluated during the incubation, in order to verify the behavior of sperm by the use of the reagent, and selecting doses to be used during cryopreservation. Sixteen ejaculates were used in the experiment II, which were cryopreserved with Botubov® extender only fraction increased or not U73122 reagent in concentrations of 10 and 20µM. Thawed samples were evaluated for sperm kinetics using the "Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) system, and for membranes integrity by the association of fluorescent probes propidium iodide, PSA-FITC and JC-1. In addition, capacitation and acrosome reaction were evaluated using fluorescent probe hydrochloride chlortetracycline (CTC) before and after the cryopreserved semen samples undergoing induction *in vitro* capacitation for 4h of incubation at 37°C. The data were submitted to analysis of variance and least significant difference test (DMS) of Tukey at 5% probability. The treatment of *in nature* spermatozoa with different concentrations of U73122 for 4h incubation at 37°C, revealed a dose-effect and time dependent on the use of this reagent in spermatozoa. Furthermore, the presence of glycerol potentiated the toxic effect of U73122 on the cells. In cryopreserved sperm, the U73122 did not affect any of the kinetic parameters evaluated by CASA system, nor the number of sperm with the plasma membrane, acrosomal and mitochondrial you merge (PIAIC) or injured (PLALS). The evaluations carried out immediately after thawing showed that the use of 10 or 20µM of inhibitor reduced the percentage of capacitated sperm and acrosome reacted in the control group ( $p>0.05$ ). After induction of *in vitro* capacitation, there was a decrease ( $p<0.05$ ) in the number of uncapacitated sperm in all treatments suggesting a reversible effect of U73122 on sperm capacitation process and acrosome reaction. In conclusion, that the use of 10 uM of U73122 reagent does not alter the kinetics of sperm *in natura* and, 10 or 20 uM concentrations of this reagent can be used in diluents for cryopreservation, since they prevent premature capacitation and acrosome reaction induced during this process, without altering the kinetics and the integrity of the sperm membrane.

**Keywords:** sperm, freezing, ram.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral .....	3
2.2 Objetivos Específicos .....	3
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1 Criopreservação do Sêmen Ovino .....	4
3.2 Capacitação Espermática .....	5
3.3 Reação Acrossomal .....	8
3.4 Aditivos para criopreservação .....	9
3.6 Avaliações Seminais <i>in vitro</i> .....	10
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	13
4. 1 Local e Período de Experimento .....	13
4.2 Animais.....	13
4.3 Desenho Experimental.....	14
4.4 Preparação de Meios e Diluidores .....	16
4.5 Coleta de Sêmen .....	16
4.6 Avaliação de Sêmen <i>in natura</i> .....	16
4.6.1 Avaliação dos parâmetros cinéticos .....	16
4.6.2 Incubação de sêmen <i>in vitro</i> .....	16
4.7 Criopreservação .....	17
4.7.1 Diluente .....	17
4.7.2 Grupos experimentais .....	17
4.7.3 Diluição e envase.....	17
4.7.4 Resfriamento e congelamento .....	17
4.7.5 Armazenamento.....	18
4.7.6 Descongelamento.....	18
4.8 Avaliação do Sêmen Criopreservado .....	18
4.8.1 Avaliação dos parâmetros cinéticos .....	18
4.8.2 Avaliação de membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial .....	19
4.8.3 Avaliação da capacitação e reação acrossomal .....	21
4.8.4 Indução da capacitação.....	22
4.9. Análise Estatística e Delineamento Experimental.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Ensaio I.....	23
4.2 Ensaio II.....	26
5. CONCLUSÕES .....	30
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31
ANEXO I.....	40
ANEXO II .....	41

ANEXO III .....	45
ANEXO IV .....	46
ANEXO V .....	47
ANEXO VI.....	48
ANEXO VII.....	49



## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com o IBGE (2004, 2014), a população ovina do Brasil passou de 15.057.838 cabeças em 2004, para 17.614.454 cabeças em 2014, o que, em termos estatísticos, significa que houve um aumento de 15% no número de ovinos no país durante estes últimos dez anos. Portanto, o número de ovinos vem apresentando um aumento médio de 1,5% a cada ano, sugerindo que, ainda que seja de maneira lenta, ovinocultura é uma atividade em crescimento no Brasil.

A ovinocultura proporciona uma alternativa de desenvolvimento socioeconômico real, pois esses animais se adaptam aos mais variados sistemas de produção, são de fácil manejo e podem estar associados a outras atividades de pecuária. Porém, para que haja um crescimento mais rápido da população de ovinos no país são necessárias mudanças no sistema produtivo destes animais, além de oferecer ao consumidor um produto padronizado e de qualidade.

Desta maneira, a aplicação de técnicas de reprodução assistida com o objetivo de aumentar a eficiência produtiva e reprodutiva do rebanho torna-se muito importante para o crescimento desta atividade. A primeira das técnicas de reprodução assistida, a inseminação artificial (IA), continua sendo a que mais contribui para o melhoramento genético em todas as espécies, sendo a mais utilizada em todo o mundo. Isso se deve a sua simplicidade de execução e seu grande potencial de disseminação da genética de um reprodutor, já que o sêmen obtido de um único ejaculado pode ser utilizado para inseminar dezenas de matrizes.

A criopreservação de sêmen é uma técnica de grande interesse nas diferentes espécies, devido ao grande potencial para formação de bancos genéticos. Porém essa técnica leva a várias alterações celulares que reduzem a capacidade fertilizante dos espermatozoides. Na espécie ovina, essas alterações são responsáveis pela redução da longevidade dos espermatozoides e pela indução prematura da capacitação espermática e da reação acrossomal, o que vem limitando o uso da IA pela via transcervical nestes animais.

A capacitação espermática envolve uma série de eventos bioquímicos que ocorrem fisiologicamente nos espermatozoides de mamíferos durante seu trajeto pelo trato reprodutivo da fêmea, mas pode ser induzida *in vitro* por vários mecanismos que ainda não estão totalmente elucidados, entre eles destacam-se as elevadas concentrações de cálcio no meio extracelular (MARQUEZ; SUAREZ, 2007).

O processo de capacitação leva os espermatozoides a sofrerem reação acrossômica. Dessa forma, o espermatozoide libera o conteúdo enzimático presente em seu acrossoma, o que lhe permite penetrar através da zona pelúcida e assim iniciar o processo de penetração no citoplasma do oócito.

A reação acrossômica envolve a fusão da membrana plasmática e a membrana acrossomal externa, mediada pela organização dos microfilamentos de actina nessa região. Tem sido demonstrado que o processo de despolimerização da actina e fusão das membranas durante a reação acrossômica depende de elevadas concentrações de cálcio (SPUNGIN; MARGALIT; BREITBART, 1995), num processo onde participam algumas fosfolipases.

Em vários tipos celulares o fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) é requerido como cofator para a atividade da fosfolipase D, mas ainda não há muitos estudos dessa ação em espermatozoides (ETKOVITZ et al., 2007). Além disso, a hidrólise do PIP<sub>2</sub> através da fosfolipase C (PLC) atua na formação de dois mensageiros intracelulares importantes, o diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), que participam da regulação das concentrações de cálcio no interior das células espermáticas (ROLDAN; SHI, 2007; ROLDAN, 1998).

O reagente U73122 (Sigma) é um inibidor da PLC, que hidrolisa o PIP<sub>2</sub> em DAG e IP<sub>3</sub>, levando a um decréscimo na concentração de cálcio livre no citosol das células. Diante do

exposto, a utilização desta substância em diluentes pode ser uma alternativa para tentar evitar a indução prematura da capacitação e a reação acrossomal, que ocorrem durante o processo de criopreservação do sêmen.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da utilização do inibidor U73122 sobre o sêmen ovino.

### 2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do inibidor U73122 sobre:

- A cinética do sêmen ovino *in natura* submetidos à incubação por 4h a 37°C na presença ou ausência de glicerol e diferentes concentrações do inibidor.
- A cinética dos espermatozoides ovinos após criopreservação.
- Integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial do sêmen ovino após criopreservação.
- O processo de capacitação, e reação acrossomal do sêmen ovino após criopreservação.
- Reversibilidade da ação do U73122, sobre a capacitação e reação acrossomal de espermatozoides ovinos após criopreservação.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Criopreservação do Sêmen Ovino

Em várias espécies, a criopreservação do sêmen leva a uma série de alterações celulares que reduzem a capacidade fertilizante dos espermatozoides quando comparados com o sêmen *in natura*. Os espermatozoides de ovinos em especial, por possuírem menor relação de colesterol/fosfolípido (DARIN-BENNETT; WHITTE, 1977) e maior permeabilidade de sua membrana plasmática (CURRY, 2000), são ainda mais sensíveis às alterações celulares produzidas durante este processo.

De maneira geral, a criopreservação consiste em submeter os espermatozoides a uma redução de temperatura (-196°C), de modo que o metabolismo dessas células também seja reduzido/parado e sua função biológica possa ser conservada por tempo indeterminado (WOLKERS; WALKER, 2015). No entanto, para que as células possam ser submetidas a este processo, é necessária a utilização de substâncias protetoras, que irão compor os diluentes para criopreservação e ajudarão a evitar os danos celulares causados pela redução da temperatura (ISACHENKO et al., 2003).

Os diluentes de sêmen ovino possuem em sua composição, basicamente o tampão tris, açúcares como glicose e/ou trealose, sais como ácido cítrico ou citrato de sódio, antibióticos como a penicilina e estreptomicina, um crioprotetor não penetrante a célula, como gema de ovo e um crioprotetor penetrante a membrana, sendo geralmente utilizado o glicerol (BARBAS; MASCARENHAS, 2009).

Nos últimos anos, várias pesquisas, principalmente relacionadas ao uso de diluentes, foram desenvolvidas, na tentativa de melhorar a criopreservação dos espermatozoides nesta espécie. A utilização de várias fontes de gema de ovo (BIN et al., 2013), diferentes concentrações de glicerol associado a substâncias como colesterol (MOTAMEDI- MOJDEHI; ROOSTAEI-ALI; RAJABI- TOUSTANI, 2014), temperatura de adição do glicerol e açúcares (PELUFO et al., 2015), entre outros aditivos (SANGEETA et al., 2015) foram testados.

Contudo, apesar destes estudos contribuírem para o aumento da qualidade do sêmen ovino após a criopreservação, desde a descoberta da ação crioprotetora do glicerol em 1949 por POLGE et al., não houve nenhum progresso significativo na viabilidade dos espermatozoides pós-descongelamento sobre as taxas de prenhez (KUMAR; MOHAMMED; NAQVI, 2014).

A dificuldade de obter elevada taxa de prenhez com a utilização de sêmen criopreservado nesta espécie tem sido atribuída aos danos sofridos pelos espermatozoides inerentes ao processo de criopreservação, sendo demonstrado que estes danos são irreversíveis e comprometem o funcionamento normal da célula após o descongelamento (MEDEIROS et al., 2002).

A membrana plasmática dos espermatozoides é formada por uma dupla camada lipídica, a qual reveste todas as outras estruturas espermáticas como a cabeça, pescoço, peça principal e flagelo e mantém o gradiente de íons e de outros componentes solúveis com o meio (SILVA; GADELLA, 2006). Durante a criopreservação, a redução da temperatura, leva as células a sofrerem uma transição em sua membrana plasmática, que deixa de ser fluida/ cristalina e passa para uma fase gel (HORVATH; SEIDEL, 2006).

Essa transição de fase, em consequência da redução de temperatura, é indicada como uma grande causadora de outras alterações celulares provocadas pela criopreservação. Isto porque, durante esta transição ocorre uma distensão da membrana plasmática da célula, que

resulta no rompimento, ou em uma alteração estrutural de proteínas, canais de íons e de quaisquer outros constituintes presentes nesta estrutura (MEDEIROS et al., 2002; WATSON, 2000).

Embora as soluções crioprotetoras sejam compostas de substâncias que protegem as células das injúrias causadas pelas criopreservação, sendo portanto essenciais para que a célula consiga sobreviver a este processo, é verificado que algumas substâncias utilizadas nessas soluções (os crioprotetores penetrantes) também induzem alterações celulares quando entram em contato com as células (RASUL; AHMED; ANZAR, 2007).

O glicerol é o crioprotetor penetrante mais utilizado em diluente para várias espécies, devido a sua eficiente capacidade de penetrar nas células e reduzir os cristais de gelo intracelular que são formados em baixas temperaturas (SALAMON; MAXWELL, 2000). No entanto é sabido, ainda que de maneira pouco aprofundada, que essa substância exerce efeitos tóxicos sobre os espermatozoides (BARBAS; MASCARENHAS, 2009; CURRY, 2000).

Ao entrar e sair da célula, o glicerol causa respectivamente, um aumento e redução do volume celular, resultando em uma modificação da morfometria dos espermatozoides (RAMÓN et al., 2013). Além disso, foi observado que este crioprotetor também modifica a estrutura da membrana plasmática, citoesqueleto e organelas dos espermatozoides mesmo sem que as células sejam expostas a baixas temperaturas (GARCÍA et al., 2012). Em conjunto, essas alterações celulares causam uma desorganização generalizada das funções espermáticas após a criopreservação. Uma dessas alterações são a desestabilização e a perda da permeabilidade seletiva da membrana plasmática ao cálcio, que tem sido associada com a ativação prematura da capacitação espermática (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000; MEDEIROS et al., 2002; WATSON, 2000), que por sua vez é relacionada com baixas taxas de fertilização dos espermatozoides ovinos criopreservados (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 1997).

### 3.2 Capacitação Espermática

A capacitação espermática compreende os eventos pelos quais os espermatozoides tornam-se aptos a fertilizar o oócito (GRASA; CEBRIÁN-PÉREZ; MUINÑO-BLANCO, 2006). Este processo pode ser dividido em eventos rápidos, onde os espermatozoides adquirem a motilidade assim que são liberados do epidídimo, e eventos lentos, onde os espermatozoides modificam seu padrão de motilidade, conhecido como hiperativação, e preparam as membranas espermáticas para submeter-se ao processo de reação acrossomal (SALICIONI et al., 2016).

Embora a capacitação espermática normalmente ocorra no trato reprodutivo da fêmea, é verificado que este processo também pode ocorrer sob diferentes condições e estímulos nos ambientes *in vitro* (BREITBART; ETKOVITZ, 2011; LUNA et al., 2015; OLMO et al., 2016).

Quando este processo é ativado antes do tempo, de maneira que os espermatozoides não consigam manter sua capacidade fecundante até encontrarem o oócito, o que geralmente ocorre com o sêmen criopreservado, considera-se que houve uma ativação prematura da capacitação.

Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de compreender as estruturas e os mecanismos pelos quais os eventos da capacitação são regulados (BALDI et al., 2000; FRASER, 2010; LINDEMANN; KANOUS, 1989; SUAREZ; HO, 2003). Embora cada um desses eventos, motilidade, hiperativação ou preparação das membranas, seja regulado por diversos outros mecanismos específicos, o envolvimento do cálcio na regulação destes é bastante conhecido (BREITBART; RUBINSTEIN; LAX, 1997; REN et al., 2001; HILDEBRAND et al., 2010).

O cálcio é um íon que regula importantes atividades dentro das células, tais como atividades de quinases, fosfatases, ativação de genes e transdução de proteínas. Devido à



importância deste íon, é observado que as células de maneira geral possuem diferentes mecanismos para regular as concentrações de cálcio em seu meio intracelular (PARODI, 2014). Nos espermatozoides, o cálcio necessário para regulação de suas atividades é proveniente do meio extracelular, onde canais de cálcio presentes na membrana plasmática promovem a entrada e saída deste íon, e/ou do meio intracelular, através da mobilização dos estoques de cálcio presentes no retículo endoplasmático dessas células (FERNANDES, 2012). Existem vários canais que participam do influxo deste íon, tais como os canais de potencial receptor transiente, os nucleotídeos cíclicos e os canais dependentes de voltagem (RAHMAN; KWON; PANG, 2014). Atualmente os estudos têm sido centralizados na investigação de um canal dependente de voltagem que foi recentemente descoberto nos espermatozoides, o CatSper (REN et al., 2001; BRENKER et al., 2012; SINGH; RAJENDER, 2014).

Foi demonstrado que este canal CatSper possui papel fundamental, e parece ser o mais importante dos canais, na regulação da motilidade espermática normal, a progressiva, uma vez que os espermatozoides murinos, cujo os genes deste canal foram modificados, apresentaram batimento flagelar lento, motilidade não progressiva, e não foram capazes de fertilizar os oócitos (REN et al., 2001).

Um estudo realizado também com camundongos (QI et al., 2007) e outros com espermatozoides equinos e humanos evidenciaram que o canal CatSper está relacionado com a regulação da motilidade e da manutenção das concentrações de cálcio intracelular, que regulam a hiperativação (ALASMARI et al., 2013; LOUX et al., 2013). No entanto, em todos esses estudos, foi verificado que o início da hiperativação depende da mobilização do cálcio presente nos estoques intracelulares (MARQUEZ; IGNOTZ; SUAREZ, 2007).

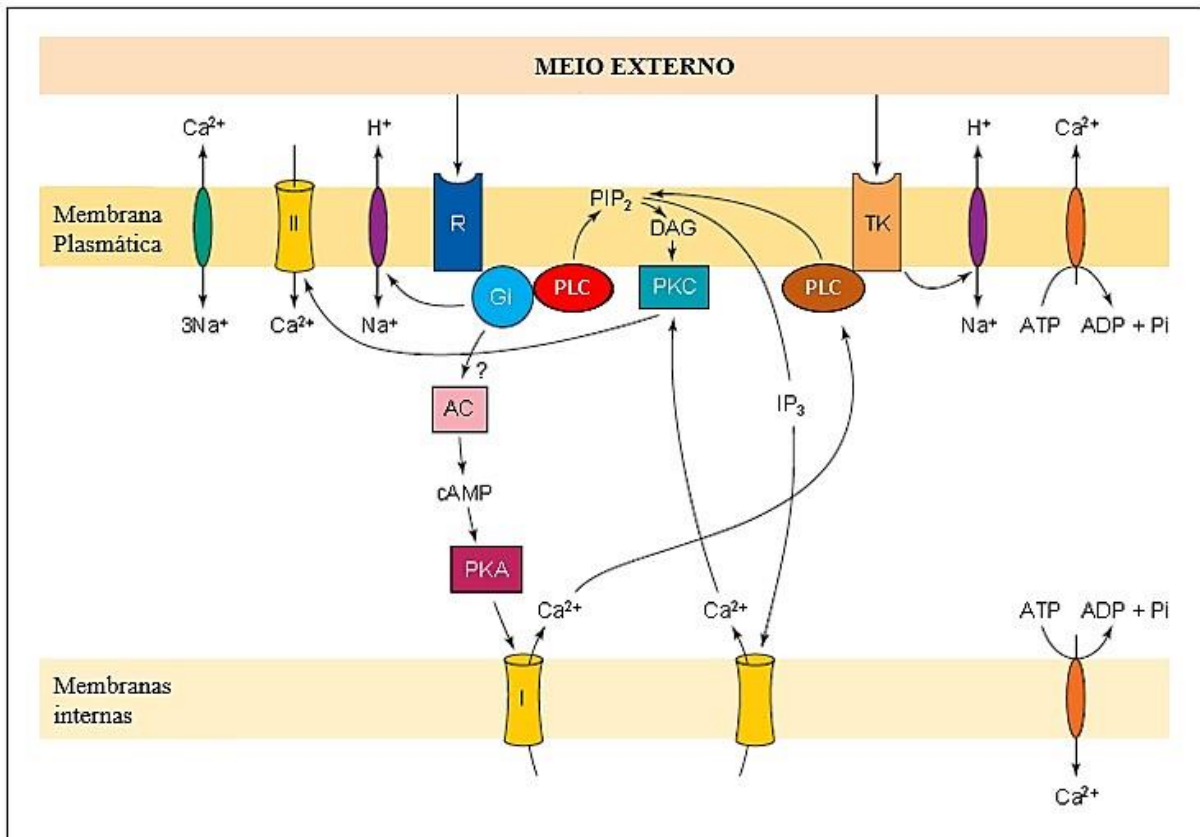
A hiperativação é um tipo de motilidade caracterizada por um batimento flagelar assimétrico e de alta amplitude, que depende do aumento e da manutenção de elevadas concentrações de cálcio na célula. Este tipo de motilidade é normalmente ativada em um tempo determinado, no local de fertilização, sendo necessária para que o espermatozoide consiga penetrar no oócito (HILDEBRAND et al., 2010).

A capacitação também é marcada por modificações celulares como a remoção do colesterol presente na superfície da membrana plasmática dos espermatozoides e alteração do pH intracelular. Estas modificações são estimuladas pelas secreções do trato reprodutivo da fêmea, e de maneira geral resultam em um aumento da fluidez da membrana plasmática e/ou desestabilização (BALDI et al., 2000; GRASA; CEBRIÁN-PÉREZ; MUÑO-BLANCO, 2006), fazendo com que essas células fiquem permeáveis a entrada do cálcio, o que também acontece quando as células são criopreservadas (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000).

A entrada do cálcio extracelular ativa a fosfolipase C (PLC), que nos espermatozoides, assim como em outras células, participa da hidrólise de um fosfolipídio que compõe a membrana, o fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>), em dois importantes mensageiros intracelulares, o diacilglicerol (DAG) e o inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) (ROLDAN; SHI, 2007; ROLDAN, 1998) conforme esquema da Figura 1. O DAG é formado e rapidamente difundido pela dupla camada lipídica nas membranas celulares. Uma vez difundida, o DAG assume uma disposição nestas membranas que cria um espaçamento entre as cabeças dos fosfolipídios, permitindo que as membranas fiquem ainda mais fluídas e desestabilizadas (GÓMEZ-FERNÁNDEZ; CORBALÁN- GARCÍA, 2007). Além disso, o DAG, transloca e ativa a proteína quinase C (PKC) (BREITBART; ETKOVITZ, 2011), a qual promove abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem presentes na membrana (WITTE; SCHAFER- SOMI, 2007).

Em diversos estudos têm sido sugerido que o influxo de cálcio, através dos canais ativados pela PKC podem ser importantes na regulação da motilidade, manutenção da hiperativação e reação acrossomal (BREITBART; ETKOVITZ, 2011; ICKOWICZ;

FINKELSTEIN; BREITBART, 2012). No entanto, como a enzima PKC possui várias isoformas e sua atividade é regulada pelo DAG, por alguns fosfolipídios e também pelo próprio cálcio, torna-se difícil realizar estudos para compreender o funcionamento desta enzima (ICKOWICZ; FINKELSTEIN; BREITBART, 2012).



**Figura1.** A hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) pela fosfolipase C (PLC) promove a formação de dois mensageiros: o diacilglicerol (DAG), que ativa e transloca a proteína quinase C (PKC) e abre canais dependentes de voltagem na membrana plasmática, e o inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) que atua sobre estoques de cálcio presente no retículo endoplasmático no interior das células. Adaptado de Breitbart et al. (1997).

Diferente do DAG que atua nas membranas celulares e sobre a PKC, favorecendo a entrada do cálcio extracelular, o IP<sub>3</sub> atua nas reservas internas deste íon. Em vários tipos celulares como, hepatócitos, células musculares, oócitos e espermatozoides, vem sendo demonstrado que este mensageiro muda a conformação de seus receptores, os IP<sub>3</sub>R, permitindo a abertura e liberação do cálcio estocado no retículo endoplasmático das células (ALASMARI et al., 2013; FINKELSTEIN et al., 2013; MOEL et al., 1995; ZHANG et al., 2005).

Os IP<sub>3</sub>R foram localizados na região do pescoço (HO; SUAREZ, 2001), e no acrossoma dos espermatozoides (WALENSKY; SNYDER, 1995; KURODA et al., 1999) sugerindo que os estoques de cálcio estão presentes nessas regiões. No entanto, a mobilização do cálcio mediado pelo IP<sub>3</sub>, parece desempenhar um papel diferente de acordo com a localização dos receptores na célula. Receptores localizados na região do pescoço estão envolvidos a indução da hiperativação, enquanto aqueles localizados na cabeça estão relacionados com o processo de reação acrossomal (HO; SUAREZ, 2001).

### 3.3 Reação Acrossomal

Após o processo de capacitação espermática é necessário que os espermatozoides passem por uma mudança fisiológica chamada de reação acrossomal, que os tornam preparados a fertilizarem o oócito (MOORE; PERSAUD, 2004). Esta reação compreende a fusão da membrana plasmática, na região da cabeça espermática, com a membrana acrossomal externa (YANAGIMACHI, 2011).

Durante este processo o conteúdo enzimático presente na parte anterior da cabeça dos espermatozoides é liberado e/ou exposto, através de orifícios criados pela fusão dessas membranas (BALDI et al., 2000). Dentre os componentes liberados na reação acrossomal está a hialuronidase que dispersa as células do *cumulus oophorus* e da corona radiata que envolvem os oócitos (BABA et al., 2002), e a acrosina, que degrada e facilita a penetração do espermatozoide através da zona pelúcida (VAZQUEZ-LEVIN et al., 2005).

A reação acrossomal ocorre naturalmente dentro do trato reprodutivo da fêmea, sendo induzida por uma ligação espécie específica dos espermatozoides a uma glicoproteína que compõe a zona pelúcida dos oócitos, a ZP3 (WASSARMAN; GUSTAVE; PLACE, 1999). Embora a glicoproteína ZP3 seja considerada o indutor fisiológico deste processo (PATRAT; SERRES; JOUANNET, 2000; TANPHAICHITR et al., 2015), a reação acrossomal também pode ocorrer nos ambientes *in vitro*, no entanto para que esta aconteça, *in vivo* ou *in vitro*, as células precisam estar previamente capacitadas (BREITBART; COHEN; RUBINSTEIN, 2005).

Os mensageiros formados pela hidrólise do PIP<sub>2</sub> durante a capacitação, DAG e IP<sub>3</sub>, parecem ser importantes para que a reação acrossomal ocorra. Tem sido sugerido que a ligação com a ZP<sub>3</sub>, ativa, por mecanismos ainda desconhecidos, a PLC dos espermatozoides, que promove o aumento da concentração intracelular desses mensageiros (BREITBART, 2002a; PARRINGTON et al., 2002).

Devido a capacidade do DAG tornar as membranas plasmática e acrossomal desestabilizadas, o aumento da concentração desse mensageiro promove uma maior fusibilidade destas (BREITBART, 2002b). No entanto o IP<sub>3</sub> parece ser fundamental na mobilização dos estoques de cálcio presentes no acrossoma dos espermatozoides, fazendo com que ocorra uma elevação da concentração de cálcio intracelular, o que leva a despolimerização dos microfilamentos de actina nessa região (SPUNGIN; MARGALIT; BREITBART, 1995).

A actina é uma proteína que compõe parte do citoesqueleto das células, incluindo os microfilamentos, que está presente em toda extensão dos espermatozoides (BRENER et al., 2003). Tem sido demonstrado que durante o processo de capacitação esta proteína sofre uma polimerização, que resulta no aparecimento de microfilamentos de actina, também conhecidas como F-actina (BREITBART; FINKELSTEIN, 2015; BRENER et al., 2003).

Quando os espermatozoides se ligam a ZP<sub>3</sub>, e um aumento das concentrações de cálcio é induzido no acrossoma, os microfilamentos se despolimerizam, fazendo com que as membranas plasmática e acrossomal externa fiquem em contato e se fundam, caracterizando o término do processo de reação acrossomal (BREITBART, 2002a, 2002b; BRENER et al., 2003; SPUNGIN; MARGALIT; BREITBART, 1995).

Vários estudos vêm demonstrando que nos espermatozoides submetidos à criopreservação, a reação acrossomal também pode ocorrer de maneira antecipada, uma vez que estas células são mais susceptíveis a sofrerem capacitação prematura (MARTECIKOVA et al., 2010; OKADA et al., 2001).

Embora os mecanismos envolvidos na indução da reação acrossomal *in vitro* ainda não sejam totalmente compreendidos, o reagente U73122, inibidor específico da PLC, poderia ser utilizado como um aditivo em diluentes, na tentativa de evitar a capacitação prematura e a

reação acrossomal nos espermatozoides criopreservados, uma vez que tem sido sugerida a participação dessa enzima no desencadeamento de ambos os processos (BREITBART; ETKOVITZ, 2011; BREITBART, 2002b; ETKOVITZ et al., 2007; ROLDAN, 1998).

### 3.4 Aditivos para criopreservação

Embora todos os compostos presentes nos diluentes de sêmen, comerciais ou não, possam também ser classificados como aditivos, atualmente, entende-se aditivos como substâncias químicas que não são de uso obrigatório nos diluentes, mas que uma vez utilizados, melhoraram a qualidade e/ou reduzem os danos espermáticos causados pela manipulação *in vitro*, principalmente pela criopreservação (PIERAZOLI; CAMPOS, 2013).

Em ovinos, atualmente diversos aditivos vem sendo testados na tentativa melhorar a criopreservação dos espermatozoides nesta espécie. Os aminoácidos L-glutamina ou L-prolina, foram utilizados em diluentes de sêmen, sendo observado que uso dessas substâncias aumentaram o número de espermatozoides com motilidade, função de membrana plasmática e integridade de acrossomal, devido as suas propriedades antioxidantes (SANGEETA et al., 2015).

Os antioxidantes são substâncias como vitaminas, minerais, pigmentos naturais, aminoácidos, ácidos graxos e outros compostos, que bloqueiam e/ou neutralizam os danos provocados pelos radicais livres (FILHO, 1994). Essas substâncias começaram a ser amplamente utilizadas como aditivos para sêmen, uma vez verificado que o estresse oxidativo gerados por estes radicais livres e peróxidos (aumento de espécies reativas ao oxigênio- ROS), podem causar depleção de ATP, peroxidação lipídica, insuficiente fosforilação axonemal, perda de motilidade entre outros, comprometendo as funções normais dos espermatozoides (BANSAL; BILASPURI, 2011).

Antioxidantes como acetato de  $\alpha$ - tocoferol, glutathione-peroxidase, Aromex®, o resveratrol, o resveratrol + vitamina E, o resveratrol + Aromex® e resveratrol + glutathione peroxidase prolongaram a motilidade de espermatozoides ovinos armazenados a 5° C quando comparados com amostras sem o uso destas substância (SARLÓS et al., 2002). No entanto um estudo realizado com um antioxidante astaxantina, durante armazenamento de 72 h a 4° C, verificou que o efeito antioxidante torna-se mais necessário após o período de 48 h, sugerindo que a redução da qualidade do sêmen ovino antes deste tempo pode está associado a outros fatores além do estresse oxidativo (FANG et al., 2015).

Muitos estudos ainda precisam ser realizados na tentativa de contornar a sensibilidade a manipulação *in vitro* e baixa viabilidade do sêmen ovino criopreservado. Um trabalho realizado com a utilização de ciclodextrinas, um tipo de carboidrato, carregados com colesterol antes da criopreservação, mostrou que o uso destas substâncias melhoraram significativamente o número de espermatozoides móveis e viáveis, após descongelamento e incubação durante três horas (MOCÉ; PURDY; GRAHAM, 2010).

Apesar de não ser bem compreendido por qual mecanismo o colesterol melhora sobrevivência espermática pós criopreservação, foi sugerido que o colesterol poderia reduzir a entrada do cálcio na célula, que é um pré-requisito para que haja capacitação (MOCÉ; PURDY; GRAHAM, 2010). Da mesma forma, um outro estudo, ao testar diferentes aditivos para criopreservação do sêmen ovino, verificou que ao utilizar o EDTA em diluente, houve melhora da motilidade, integridade acrossomal e da membrana plasmática, provavelmente devido a sua capacidade de quelar os íons de cálcio e evitar a ocorrência de processos como a reação acrossomal de maneira antecipada (MUKHERJEE et al., 2016).

Esses estudos contribuem como indicadores de que a capacitação prematura, assim como a reação acrossomal, estão de fato relacionados com a baixa viabilidade dos espermatozoides ovinos submetidos a criopreservação. Embora o uso do colesterol e EDTA, tenham sido utilizados com melhorias na criopreservação desta espécie, o uso destes aditivos em diluentes ainda não tornou-se rotineira, o que pode estar relacionado a falta de melhoria sobre as taxas de prenhez nesta espécie (PURDY et al., 2016).

Desta maneira o estudo de outras substâncias aditivas, como o U73122, que poderiam evitar a capacitação prematura e a antecipação da reação acrossomal, tornam-se necessárias, na tentativa de melhorar a qualidade dos espermatozoides ovinos criopreservados, além das taxas de prenhez em ovinos.

### **3.5 Reagente U73122**

O reagente U73122 (Sigma) é um aminoesteróide penetrante as membranas celulares, conhecido por ser um inibidor seletivo/específico da PLC, que inibe a hidrólise da PIP2 em DAG e IP3, e leva a um decréscimo das concentrações de cálcio livre no citosol das células. Desde que sua ação sobre a atividade da PLC foi demonstrada em neutrófilos humanos (BLEASDALE et al., 1990; SMITH et al., 1990), este reagente vem sendo utilizado rotineiramente em pesquisas científicas, nos mais variados tipos celulares.

O U73122 foi capaz de reduzir e/ou inibir totalmente a atividade da PLC em diferentes células, tais como hepatócitos e músculo liso de roedores (MACMILLAN; MCCARRON, 2010; MOEL et al., 1995), oócitos murinos, anfíbios e de anelídeos (NAKANO; KYOZUKA, 2014; WU et al., 2001; ZHANG et al., 2005). No entanto seu efeito sobre a PLC parece depender da dose, do tipo, e dos fatores individuais de cada célula.

Nas células hepáticas e musculares de roedores, as doses de U73122 necessárias para inibir completamente a atividade PLC foram 30 e 10 $\mu$ M, respectivamente (MACMILLAN; MCCARRON, 2010; MOEL et al., 1995). Em oócitos, as concentrações iguais ou acima de 20 $\mu$ M inibiram completamente a PLC, em todas as células, independente da espécie. No entanto, quando 10 $\mu$ M do reagente foram utilizados, apenas 40% dos oócitos murinos, 20% dos de anfíbios, e 69% de anelídeos, tiveram a atividade da PLC bloqueadas (NAKANO; KYOZUKA, 2014; WU et al., 2001; ZHANG et al., 2005).

De maneira geral, as concentrações de U73122 capazes de reduzir e/ou inibir a atividade da PLC nas células parecem variar entre 10 a 30 $\mu$ M. Além disso, a utilização deste inibidor vem sendo interessante em estudos que investigam estímulos celulares envolvidos com estoques intracelulares cálcio, uma vez que os mensageiros gerados pela PLC, DAG e/ou IP3, atuam, direta ou indiretamente, sobre a mobilização destas reservas (MIKOSHIBA, 2007).

Embora este reagente venha sendo utilizado sem qualquer restrição na metodologia de várias pesquisas, ainda não há estudos sobre seu efeito em espermatozoides. Desta maneira, a possibilidade de utilizar o U73122 em diluentes de sêmen, na tentativa de prevenir a capacitação prematura e reação acrossomal causadas pelo processo de criopreservação, deve ser fundamentada pela prévia avaliação de seus efeitos sobre as células espermáticas.

### **3.6 Avaliações Seminais *in vitro***

As avaliações seminais de uma maneira geral, buscam estimar o potencial fertilizante de amostras espermáticas (GRAHAM, 2001). No entanto a utilização de avaliações seminais *in*

*vitro*, além de estimarem o potencial fertilizante, também vem auxiliando a investigação do efeito de diferentes substâncias como crioprotetores, compostos e aditivos de diluentes, sobre o comportamento e qualidade dos espermatozoides (GARCÍA et al., 2012; SANGEETA et al., 2015; YÁÑIZ et al., 2015).

A motilidade é um importante parâmetro cinético a ser avaliado em amostras de sêmen, podendo ser considerado como um indicativo de que as células espermáticas possuem boa viabilidade e integridade (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003; (VERSTEGEM; IGUEROUADA; ONCLIN, 2002). Além disso, este e outros padrões cinéticos dos espermatozoides, vem ajudando a avaliar reagentes reguladores de cálcio (FINKELSTEIN et al., 2013; MARQUEZ; SUAREZ, 2007; ROTEM et al., 1990) uma vez que os batimentos flagelares são estreitamente regulados por este íon (PARODI, 2014).

Os parâmetros cinéticos dos espermatozoides podem ser avaliados de maneira subjetiva, através de microscopia óptica, ou através de sistemas automatizados (Hardware e Software) que visualizam, digitalizam e processam sucessivas imagens dos espermatozoides conhecidos como sistemas *Computer Assisted Sperm Analysis* -CASA (AMANN; KATZ, 2004).

Atualmente existem vários sistemas de análises computadorizadas disponíveis no mercado, como Hamilton Thorn (Hamilton Thorn Research, Beverly, USA), Sperm Class Analyzer® (Microptic SL, Barcelona, Espanha), SM-CMATM (MTM Medical Technologies, Montreaux, Switzerland). A utilização destes sistemas possibilitam uma avaliação mais precisa e segura da cinética individual e/ou coletiva de amostras seminais, além de proporcionarem a observação de movimentos espermáticos que não são detectáveis pelas avaliações subjetivas (AMANN; KATZ, 2004).

Os principais parâmetros cinéticos gerados pelos sistemas CASA são: Motilidade Total (%), que refere-se à população de células que estão se movendo com uma velocidade mínima determinada no *setup*, sendo a proporção total de células móveis; Motilidade Progressiva (%), refere-se à porcentagem de células movendo-se progressivamente; Velocidade de Trajeto (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), é a velocidade média sem interrupção do trajeto da célula; Velocidade Progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), é a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto; Velocidade Curvilinear (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), é a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula; Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ), é a largura média da oscilação da cabeça conforme a célula se move; Freqüência de Batimentos (BCF, Hz), é a freqüência com que a cabeça do espermatozóide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido; Retilinearidade (STR, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VAP; Linearidade (LIN, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VCL; e Velocidade Rápida (%) (ARRUDA et al., 2011).

Embora ainda não seja claro qual e/ou quais parâmetros avaliados pelo sistema CASA poderiam prever de maneira real as taxas de fertilização em ovinos (TSAKMAKIDIS, 2010), alguns padrões, como o VCL e VAP, vem sendo positivamente correlacionados com a capacidade dos espermatozoides penetrarem no muco cervical (ROBAYO; MONTENEGRO; VALDE, 2008), assim como o VCL, ALH e BCF que foram utilizados como indicadores de hiperativação espermática *in vitro* (MARQUEZ; SUAREZ, 2007; MORTIMER; MAXWELL, 1999).

Um estudo realizado por KIRK (2001) verificou que espermatozoides móveis podem possuir danos em suas membranas plasmática, acrossomal e/ou mitocondrial comprometendo a fertilização dos oócitos, uma vez que estas estruturas conferem aos espermatozoides capacidade de sofrerem capacitação e reação acrossomal no trato reprodutivo da fêmea (MORTIMER; MAXWELL, 1999). Desta maneira além da cinética, avaliações das membranas espermáticas são necessárias afim de compreender o complexo funcionamento destas células e os processos que antecedem a fertilização.

Diversos testes tem sido empregados para avaliar a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides. O teste hiposmótico é uma técnica simples e consiste em submeter os espermatozoides à soluções com baixa osmolaridade onde as células íntegras, sofrem um processo de inorgitamento e sua cauda tornam-se enrolada (RAMU; JEYENDRAN, 2013). Além desse, existem corantes supravitais, tais como eosina/nigrosina e Trypan Blue, que permitem a identificação de espermatozoides íntegros e lesados (PARTYKA; NI, 2012) e o uso de sondas fluorescentes que vem sendo cada vez mais utilizados entre as técnicas de avaliação das membranas espermáticas (ARRUDA et al., 2011).

As sondas fluorescentes possuem característica de identificar estruturas específicas nos espermatozoides, podendo detectar a integridade e funcionalidade destas células de maneira mais rápida e específica (CELEGHINI, 2005). Embora existam muitas sondas disponíveis comercialmente, o iodeto de propídio que penetra apenas em células com membrana lesada e/ou permeável ligando-se ao DNA, o PSA-FITC capaz de ligar-se a carboidratos presentes nos acrossomas lesados e o marcador de função mitocondrial, JC-1 (SILVA; GADELLA, 2006) foram utilizados, com sucesso na avaliação das membranas plasmática, acrossomal e na função mitocondrial respectivamente, de espermatozoides ovinos (CELEGHINI et al., 2010).

Assim como o IP, PSA- FITC e o JC-1, o uso da sonda cloridrato de clortetraciclina (CTC) tem sido vantajosa nos estudos voltados a avaliação da capacitação espermática do sêmen ovino. O CTC liga-se ao cálcio presente nas células, indicando através dos padrões de fluorescência emitida, os espermatozoides não capacitados, capacitados, e diferente de outras sondas, é possível observar também células com acrossoma reagido (CUNHA; CARVALHO; DODE, 2015; SILVA; GADELLA, 2006).

A especificidade, a possibilidade de associação de algumas sondas para avaliação de estruturas de maneira simultânea, além da leitura das amostras que podem ser realizadas por microscopia de fluorescência ou por citometria de fluxo, fornecendo rapidez e avaliação de um número maior células (CORDELLI et al., 2005), favorece a utilização de sondas fluorescentes em diversas avaliações espermáticas.

Embora existam várias sondas fluorescentes utilizadas para avaliar diferentes estruturas e processos espermáticos como a translocação de fosfolipídios de membrana, o índice de caspase-ativada, o índice de fragmentação de DNA, além várias outras técnicas capazes de avaliar diferentes atributos de espermatozoides, sabe-se que ainda não existe nenhuma sonda e/ou técnica capaz de predizer, de maneira isolada, a capacidade fertilizante de uma amostra seminal de maneira confiável (GRAHAM; MOCE, 2005). Neste contexto, os estudos de maneira geral, sugerem a utilização de vários testes em conjunto, na tentativa de compreender e obter melhores informações sobre o potencial fertilizante de amostras seminais (GRAHAM, 2001).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para utilização de animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense- UENF, Campos dos Goytacazes/ RJ sob número 374867 no ano de 2013.

### 4.1 Local e Período de Experimento

O experimento foi conduzido na Unidade de Apoio à Pesquisa- UAP do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal -LRMGA localizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense- UENF, Campos dos Goytacazes/RJ- Brasil (21° 76' 30'' latitude, 41° 29' 18'' longitude), entre maio e novembro de 2015.

As avaliações computadorizadas do sêmen criopreservado pelo sistema “*Computer Assisted Sperm Analysis*” (CASA), foram realizadas no Laboratório de Andrologia e Endocrinologia da Faculdade de Veterinária, localizada na Universidade Federal Fluminense-UFF, Niterói / RJ- Brasil (22° 90'48'' latitude, 43°09' 84'' longitude), durante novembro de 2015.

### 4.2 Animais

Durante todo o experimento foram utilizados quatro carneiros da raça Santa Inês (Figura 2) com idades entre 20-24 meses em boas condições corporais (escore  $\geq 3$  em escala de 1 a 5), mantidos em baias coletivas com água, feno e sal mineral *ad libitum*, alimentados duas vezes ao dia com 600g de ração granulada da marca Presence® linha ovinos (16% PB).

Os animais utilizados foram previamente condicionados a regimes de coletas de sêmen com vagina artificial e classificados como aptos após realização de exame andrológico. Os ejaculados foram avaliados segundo os padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).



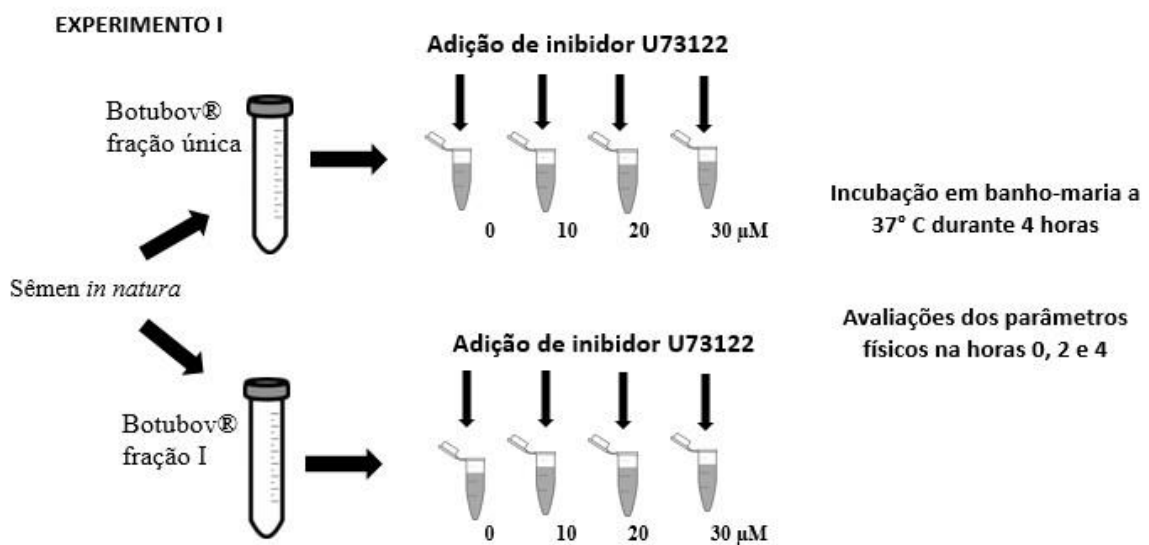
**Figura 2.** Reprodutores Santa Inês submetidos a coletas de sêmen durante o experimento.



### 4.3 Desenho Experimental

#### Ensaio I

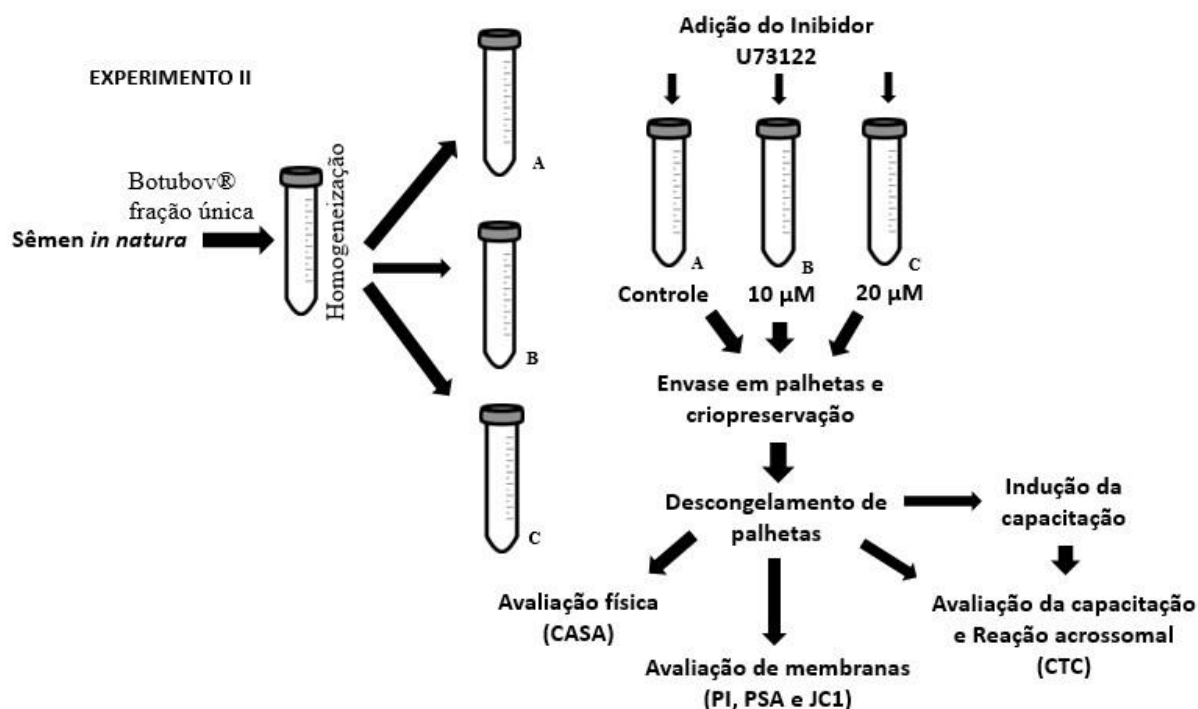
As fases do experimento I encontram-se esquematizadas na Figura 3. O sêmen *in natura* foi diluído em Botubov® fração única (com glicerol) e fração I (sem glicerol), sendo em seguida redistribuídas em microtubos e acrescidas das concentrações de 0, 10, 20, 30 $\mu$ M do inibidor U73122, na presença ou não de glicerol. As amostras foram submetidas à incubação a 37°C durante 4 horas. Parâmetros cinéticos dos espermatozoides foram avaliados pelo sistema CASA (Hamilton Torn Research - HRT) com 0, 2 e 4 horas de incubação.



**Figura 3.** Esquematização das fases do ensaio I, onde foi realizada a diluição do sêmen *in natura* em Botubov® fração única (com glicerol) e fração I (sem glicerol), redistribuição do sêmen diluído em microtubos e acréscimo de diferentes concentrações do inibidor U73122 (0, 10, 20, 30 $\mu$ M) das amostras submetidas à incubação a 37°C durante 4 horas, e avaliações de parâmetros físicos nas horas 0 (imediatamente após acréscimo do inibidor), 2 e 4 durante a incubação.

## Ensaio II

As fases do experimento II encontram-se esquematizadas na Figura 4. O sêmen *in natura* foi diluído em Botubov® fração única, em seguida o sêmen foi redistribuído em tubos cônicos de 15mL, sendo acrescido das concentrações de 0, 10, 20 $\mu$ M do inibidor U73122. As amostras foram envasadas em palhetas francesas previamente identificadas e posteriormente submetidas a criopreservação. Após descongelamento foram realizadas avaliações dos parâmetros físicos no sistema computadorizado (*Computer Assisted Sperm Analysis* -CASA), avaliações da integridade de membranas e da capacitação e reação acrossomal dos espermatozoides.



**Figura 4.** Esquematização das fases do ensaio II, onde foi realizada a diluição do sêmen *in natura* em Botubov® fração única (com glicerol), redistribuição do sêmen diluído em tubos cônicos de 15mL, acréscimo de diferentes concentrações do inibidor U73122 (0, 10, 20 $\mu$ M), posterior envase e criopreservação. As amostras foram descongeladas e submetidas às avaliações físicas, de membranas e capacitação e reação acrossomal (antes e após indução da capacitação).

#### **4.4 Preparação de Meios e Diluidores**

Todos os meios utilizados neste estudo foram preparados no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal- LRMGA localizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense- UENF, Campos dos Goytacazes/ RJ, com exceção dos diluidores comerciais para sêmen BotuBov® fração única (com glicerol) e fração I (sem glicerol) que foram obtidos diretamente da empresa Botupharma Brasil (Botucatu-São Paulo).

Os reagentes utilizados neste experimento com seus respectivos códigos, marcas e a concentração nos meios preparados encontram-se discriminados nos anexos I e II, respectivamente.

#### **4.5 Coleta de Sêmen**

As coletas de sêmen foram realizadas pelo método da vagina artificial utilizando-se uma ovelha como manequim. A vagina artificial foi previamente preenchida com água aquecida e ar, proporcionando uma temperatura interna de 41°C. Na extremidade posterior da vagina artificial foi acoplado um tubo coletor graduado revestido com papel laminado impedindo o contato do sêmen com luz.

#### **4.6 Avaliação de Sêmen *in natura***

##### **4.6.1 Avaliação dos parâmetros cinéticos**

Imediatamente após a coleta, o volume de sêmen foi verificado através de um tubo graduado (mL). Em seguida foram avaliados parâmetros físicos de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e o número de espermatozoides rápidos (RAP).

Para determinação da MT, MP e RAP adicionou-se 10µL de sêmen *in natura* previamente diluído em BotuBov® fração I, (1:10) entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C. A avaliação dos espermatozoides foi realizada em cinco campos aleatórios, com auxílio do sistema computadorizado Ceros, versão 10.2 (Hamilton Torn Research - HRT) acoplado a um microscópio óptico, sob aumento de 400 vezes. Os valores obtidos foram expressos em percentagem (%).

A determinação das concentrações espermáticas foi realizada pela prévia diluição do sêmen em água (1:1600) e a contagem feita com auxílio de uma câmara hemocitométrica (Neubauer) em microscópio óptico, sob aumento de 400 vezes, determinando a quantidade de espermatozoides/mL.

Apenas os ejaculados que possuíam um volume mínimo de 1mL, valores  $\geq 80\%$ , para MT, MP e RAP, e uma concentração de  $\geq 2 \times 10^9$  espermatozoides/ mL foram utilizados durante as etapas do experimento.

##### **4.6.2 Incubação de sêmen *in vitro***

Após determinada a concentração espermática, parte do sêmen *in natura* foi diluída em 3mL de diluente BotuBov® fração única (com glicerol) ou em 3mL de diluente BotuBov® fração I (sem glicerol), em tubos cônicos de 15mL de maneira que a concentração final fosse de  $60 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

Após homogeneização, as amostras diluídas foram redistribuídas em alíquotas de 300µL em 12 microtubos (6 alíquotas com crioprotetor e 6 alíquotas sem crioprotetor). Em seguida,

diferentes concentrações do U73122 (0, 10, 20, 30 $\mu$ M) foram acrescentadas às alíquotas com e sem a presença do glicerol.

As alíquotas foram avaliadas imediatamente após o acréscimo do U73122 (hora 0) e a cada 2 horas, durante um total de incubação de 4 horas (hora 2, 4). Os parâmetros avaliados durante o teste de termorresistência foram MT, MP, RAP conforme descrito no item 4.6.1.

## **4.7 Criopreservação**

### **4.7.1 Diluente**

Para a criopreservação do sêmen foi utilizado o diluente comercial BotuBov® (Botupharma, Botucatu-SP), fração única (com glicerol). O diluidor presente nos frascos de 100 mL foi dividido em alíquotas de 8mL, depositadas em tubos cônicos de 15mL e congelados por um período máximo de 15 dias.

### **4.7.2 Grupos experimentais**

Foram utilizados três grupos experimentais que se diferiam pela concentração de U73122 acrescida ao diluente na criopreservação de sêmen ovino. As amostras sem inibidor foram consideradas como grupo controle, e amostras com as concentrações de 10 ou 20 $\mu$ M do inibidor U73122 no diluente para criopreservação foram considerados grupos experimentais.

### **4.7.3 Diluição e envase**

Após determinada a concentração espermática, o sêmen *in natura* foi diluído em 12mL de diluente BotuBov® fração única com auxílio de um tubo cônico de 15mL de maneira com que a concentração final fosse de  $60 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Após homogeneização, o sêmen diluído foi redistribuído em três tubos cônicos (4mL de sêmen diluído em cada tubo). Em seguida, o U73122 foi acrescentado em cada um dos três tubos, de maneira que a concentração final do inibidor em cada um dos tubos fosse 0, 10 e 20 $\mu$ M, respectivamente.

O sêmen foi envasado em palhetas francesas de 0,5mL, previamente identificadas pelo número do animal, concentração de inibidor U73122 (0, 10 ou 20 $\mu$ M), e data do congelamento. O envase consistiu na aspiração do sêmen para o interior das palhetas sendo estas imediatamente seladas com álcool polivinílico - PVA.

### **4.7.4 Resfriamento e congelamento**

O resfriamento foi realizado em uma caixa de isopor de 15 litros, com 30cm de altura, 19cm de largura e 39cm de comprimento, 6 litros de gelo moído distribuído uniformemente no fundo da caixa. As palhetas de sêmen foram colocadas sobre uma plataforma mantida a 5cm de altura da superfície do gelo (FORERO- GONZALEZ et al., 2012)

As palhetas foram mantidas na caixa com gelo por 2 horas e 30 minutos, onde atingiram e permaneceram a 5°C durante este tempo. Após este período, a plataforma com as palhetas foi transferida para outra caixa de isopor com as mesmas dimensões da caixa de resfriamento, onde as palhetas na posição horizontal ficaram a uma distância de cinco centímetros do nitrogênio líquido a uma temperatura de -153°C, por um período de 15 minutos, e posteriormente mergulhadas diretamente em N<sub>2</sub>L.

#### **4.7.5 Armazenamento**

As palhetas foram armazenadas no interior de botijão criogênico em raques identificadas pelo número do animal, concentração do inibidor utilizado e data da criopreservação, permanecendo a  $-196^{\circ}\text{C}$  até o descongelamento para posterior avaliação.

#### **4.7.6 Descongelamento**

As palhetas foram descongeladas com auxílio de um descongelador de sêmen automático (WTA- Watanabe Tecnologia Aplicada), em uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos, sendo o conteúdo de cada palheta depositado em um microtubo pré-aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$ , e posteriormente submetido a avaliações pós-descongelamento. Para cada avaliação pós-descongelamento uma palheta foi utilizada.

### **4.8 Avaliação do Sêmen Criopreservado**

#### **4.8.1 Avaliação dos parâmetros cinéticos**

Imediatamente após o descongelamento, o sêmen foi novamente diluído em BotuBov® fração I (1:10), previamente aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$ . Uma alíquota de  $10\mu\text{L}$  do sêmen diluído foi depositada entre lâmina e lamínula aquecidas a  $37^{\circ}\text{C}$ , sendo realizada a contagem dos espermatozoides em cinco campos aleatórios com auxílio do sistema computadorizado “*Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)*”, acoplado a um microscópio Nikon Eclipse Ci-Nikon Corporation – Japão), sob aumento de 400x. Os parâmetros mensurados pelo equipamento que foram utilizados na análise dos dados estão apresentados na Quadro 1.

**Quadro 1.** Parâmetros físicos relacionados à qualidade espermática mensurados pelo sistema computadorizado *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA), utilizados na análise dos dados do experimento.

PARÂMETROS		SIGLA
1	Motilidade Total ( <i>non-progressive+ progressive motile %</i> )	MT
2	Motilidade Progressiva ( <i>Progressive motile %</i> )	MP
3	Espermatozoides com deslocamento: Rápido ( <i>Rapid %</i> ),	RAP
4	Velocidade curvilínea ( <i>Curvilinear Velocity <math>\mu\text{m/s}</math></i> )	VCL
5	Velocidade em linha reta ( <i>Straight-line Velocity <math>\mu\text{m/s}</math></i> )	VSL
6	Velocidade de trajeto média ( <i>Average Path Velocity <math>\mu\text{m/s}</math></i> )	VAP
7	Linearidade ( <i>Linearity %</i> )	LIN
8	Retilinearidade ( <i>Straightness %</i> )	STR
9	Deslocamento de cabeça ( <i>head displacement <math>\mu\text{m/s}</math></i> )	ALH
10	Batimento/ frequência cruzada ( <i>Beat/Cross Frequency Hz</i> )	BCF
11	Hiperatividade ( <i>Hyperactive %</i> )	HYP

#### 4.8.2 Avaliação de membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial

Para a determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomal e função mitocondrial, o sêmen pós-descongelamento foi diluído em meio PBS – Phosphate Buffered Solution (1:3), de maneira que concentração final fosse de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/ mL.

Em seguida, 50 $\mu\text{L}$  do sêmen diluído foram depositados em um microtubo, e foi realizada marcação tripla, sendo adicionado 1 $\mu\text{L}$  de Iodeto de propídeo (PI), 7 $\mu\text{L}$  de aglutinina de *Pisum sativum* associada ao isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC) e 7 $\mu\text{L}$  de Iodeto de 5,5',6,6' tetracloro-1,1,3,3'' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1). As soluções de uso foram preparadas segundo Celeghini (2005).

Foram realizadas preparações úmidas entre lâmina e lamínula e contados 200 espermatozoides de cada amostra utilizando um microscópio de epifluorescência (Nikon, modelo Eclipse TE 300, Melville, NY – USA), sob aumento de 400 vezes e filtro triplo. Os espermatozoides foram classificados segundo proposto por Celeghini (2005) conforme apresentado nos Quadros 2 e 3.

**Quadro 2.** Classificação dos espermatozoides em categorias de acordo com a integridade das membras plasmática e acrossomal e função mitocondrial, detectadas pelos marcadores fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1, respectivamente.

CATEGORIA		SIGLA
1	Membrana plasmática intacta, Acrossoma intacto e Com função mitocondrial	<b>PIAIC</b>
2	Membrana plasmática intacta, Acrossoma intacto e Sem função mitocondrial	<b>PIAIS</b>
3	Membrana plasmática intacta, Acrossoma lesado e Com função mitocondrial	<b>PIALC</b>
4	Membrana plasmática intacta, Acrossoma lesado e Sem função mitocondrial	<b>PIALS</b>
5	Membrana plasmática lesada, Acrossoma intacto e Com função mitocondrial	<b>PLAIC</b>
6	Membrana plasmática lesada, Acrossoma intacto e Sem função mitocondrial	<b>PLAIS</b>
7	Membrana plasmática lesada, Acrossoma lesado e Com função mitocondrial	<b>PLALC</b>
8	Membrana plasmática lesada, Acrossoma lesado e sem função mitocondrial	<b>PLALS</b>

Adaptado de Celeghini (2005)

**Quadro 3.** Classificação dos espermatozoides de acordo com a fluorescência emitida pela associação dos marcadores fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1.

ESPERMATOZOIDE	PI	FITC-PSA	JC1
Membrana plasmática intacta, Acrossoma intacto e Com função mitocondrial (PIAIC)	-	-	<b>Vermelho</b>
Membrana plasmática intacta, Acrossoma intacto e Sem função mitocondrial (PIAIS)	-	-	<b>Verde</b>
Membrana plasmática intacta, Acrossoma lesado e Com função mitocondrial (PIALC)	-	+	<b>Vermelho</b>
Membrana plasmática intacta, Acrossoma lesado e Sem função mitocondrial (PIALS)	-	+	<b>Verde</b>
Membrana plasmática lesada, Acrossoma intacto e Com função mitocondrial (PLAIC)	+	-	<b>Vermelho</b>
Membrana plasmática lesada, Acrossoma intacto e Sem função mitocondrial (PLAIS)	+	-	<b>Verde</b>
Membrana plasmática lesada, Acrossoma lesado e Com função mitocondrial (PLALC)	+	+	<b>Vermelho</b>
Membrana plasmática lesada, Acrossoma lesado e sem função mitocondrial (PLALS)	+	+	<b>Verde</b>

PI positivo (+) = núcleo corado em vermelho

FITC positivo (+) = região do acrossoma verde-amarelado

Adaptada de Celeghini (2005)

### 4.8.3 Avaliação da capacitação e reação acrossomal

Para determinação do número de espermatozoides que sofreram capacitação e reação acrossomal, o volume de cada palheta de sêmen, após descongelamento (volume 0,5mL), foi diluído em 1mL de PBS (1:2) previamente aquecido a 37°C em um microtubo, em seguida submetido a centrifugação de 600 x g (3000 rpm) durante 2 minutos em mini centrífuga MiniSpin- Eppendorff (MiniSpin Plus).

Após a centrifugação do sêmen diluído, o sobrenadante foi removido e apenas o *pellet* foi mantido no microtubo, sendo depositado mais 1 mL de PBS aquecido a 37°C e a amostra mais uma vez submetida a centrifugação a 600 x g por 2 minutos. Ao término da segunda centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado e 500µL de PBS aquecido foram depositados ao *pellet*, sendo este homogeneizado e uma alíquota de 50µL utilizada para diluição com o marcador fluorescente *clortetraciclina*- CTC (1:1) em um novo microtubo.

Foram realizadas preparações úmidas entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37°C com auxílio de placa aquecedora, sendo utilizados para estas preparações úmidas 8µL de sêmen diluído ao marcador CTC, 8µL de meio DABCO para que houvesse emissão de fluorescência, e 0,2µL de paraformaldeído para fixação dos espermatozoides.

Em cada amostra foram contados 200 espermatozoides utilizando um microscópio de epifluorescência (Nikon, modelo Eclipse TE 300, Melville, NY- USA), sob aumento de 600 x e filtro de excitação de 440nm e emissão de 470nm. Os espermatozoides foram classificados segundo o proposto por Fraser et al. (1995) e encontra-se discriminado no quadro 4.

**Quadro 4.** Classificação dos espermatozoides de acordo com a fluorescência emitida pelo marcador fluorescente *clortetraciclina*- CTC.

CATEGORIA	ESPERMATOZOIDE	SIGLA
<b>Não capacitado</b>	Superfície totalmente fluorescente	<b>NC</b>
<b>Capacitado</b>	Perda de fluorescência na região pós acrossomal	<b>CP</b>
<b>Acrossoma Reagido</b>	Perda de fluorescência na região pós acrossomal e acrossomal, expressando fluorescência apenas na peça intermediária	<b>AR</b>



#### 4.8.4 Indução da capacitação

Após o descongelamento, amostras de sêmen foram submetidas à indução da capacitação *in vitro*. Para isso, inicialmente 250µL de sêmen foram depositados em um microtubo contendo um gradiente de densidades, (gradiente descontínuo *Percoll*), sendo este submetido a centrifugação 3000rpm (600 x g) durante 15 minutos em mini centrífuga da marca Mini Spin- Eppendorff.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* presente no microtubo foi acrescentado 1mL de PBS previamente aquecido a 37°C. Após homogeneização do *pellet* e o PBS, o microtubo foi novamente submetido à centrifugação a 600 x g durante 2 minutos e o sobrenadante ao término foi descartado.

Para induzir a capacitação dos espermatozoides *in vitro* foi utilizado meio Talp *sp* acrescidos de heparina, preparada três horas antes e mantida em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific modelo 310) a uma temperatura de 37°C até o momento de utilização.

Foram acrescentados 200µL de meio Talp *sp* aos espermatozoides presentes no *pellet* de cada microtubo, após a segunda centrifugação, e realizada uma homogeneização. Em seguida os microtubos foram identificados e o sêmen submetido à incubação durante um período total de 4h, em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, a uma temperatura de 37°C.

Ao término das quatro horas de incubação as amostras foram retiradas da incubadora e submetidas a duas centrifugações sucessivas de 600 x g durante 2 minutos, em centrífuga. A primeira centrifugação foi sem acréscimo de nenhum diluidor com posterior descarte do sobrenadante, e na segunda foi adicionada ao *pellet* 1 mL de PBS previamente aquecido.

Ao término da segunda centrifugação, os espermatozoides presentes no *pellet* foram novamente diluídos a 200µL de PBS e submetidas a sucessivas pipetagens. Uma alíquota de 50µL foi utilizada para diluição com o marcador fluorescente CTC (1:1) em um novo microtubo. A preparação das amostras para avaliação dos espermatozoides capacitados e com acrossoma reagido foi realizada conforme o item 4.8.3.

#### 4.9. Análise Estatística e Delineamento Experimental

Todo o experimento foi realizado segundo o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4 (concentrações de inibidor x ovinos) com 4 repetições (ejaculado), exceto o ensaio I (incubação do sêmen *in natura*) que foi realizado no esquema fatorial 3x 2x 4 (tempos x glicerol x concentrações de inibidor) com 4 repetições (ejaculados).

Todas as variáveis observadas na avaliação dos parâmetros físicos, do sêmen criopreservado ou não, avaliação de membranas, capacitação e reação acrossomal foram submetidos aos testes de normalidade (Teste de Lilliefors) e homocedasticidade (Teste de Cochran & Bartlett), não atendendo as pressuposições da análise da variância (ANOVA). Portanto, os dados foram transformados pela raiz quadrada ( $X+0,5$ ) para interpretação da ANOVA e apresentados sem transformação.

Todas as variáveis observadas não apresentaram efeito significativo para a independência entre concentração de inibidor e ovinos, impedindo o uso de teste protegidos pela ANOVA. O teste da diferença mínima significativa de Tukey ( $p<0,05$ ) foi utilizado para comparação dos efeitos independentes para os níveis de inibidores e reprodutores.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ensaio I

#### **Avaliação de diferentes concentrações do U73122 sobre parâmetros físicos do sêmen *in natura***

O U73122, inibidor específico / seletivo da fosfolipase C, tem sido utilizado nos mais variados tipos celulares para avaliação de rotas bioquímicas dependentes do cálcio intracelular (MACMILLAN; MCCARRON, 2010; NAKANO; KYOZUKA, 2014; ZHANG et al., 2005; WU et al., 2001). A fosfolipase C atua na hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>), formando o diacilglicerol (DAG) e o fosfatidilinositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). O DAG transloca e ativa a proteína quinase C (PKC), enzima que promove a abertura dos canais de cálcio da membrana plasmática, e o IP<sub>3</sub> atua liberando o cálcio armazenado no retículo endoplasmático.

Considerando que ainda não se tem relatos na literatura sobre os efeitos do U73122 em espermatozoides, buscou-se definir num primeiro momento, uma concentração do inibidor que permitisse seu uso em diluentes para criopreservação do sêmen ovino, de forma segura, a fim de contornar o problema da capacitação e reação acrossomal prematura induzida pela criopreservação do sêmen, processos que são mediados pela elevação da concentração intracelular do cálcio (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000; PÉREZ et al., 1996).

Para tanto, as amostras foram diluídas em diluentes com ou sem glicerol, suplementados com diferentes concentrações do U73122. Nas amostras mantidas em diluentes sem glicerol, foi observada apenas uma redução da motilidade progressiva no tempo inicial (0 h), nos tratamentos que receberam as maiores concentrações (20 e 30  $\mu$ M) do inibidor. No entanto, às 4h de incubação, as amostras tratadas com 10  $\mu$ M apresentaram um aumento ( $p < 0,05$ ) da motilidade progressiva em relação ao controle (Figura 5). Esse resultado demonstra um efeito dose e tempo dependentes do inibidor.

Estudos realizados com oócitos de anelídeos (NAKANO; KYOZUKA, 2014), anfíbios (WU et al., 2001), murinos (ZHANG et al., 2005), hepatócitos (MOEL et al., 1995) e células musculares de roedores (MACMILLAN; MCCARRON, 2010), também demonstraram um efeito dose e tempo dependentes do U73122. O tratamento de oócitos de roedores com 10  $\mu$ M do U73122 impediu as oscilações de cálcio intracelular em 40% desses gametas, no entanto o tratamento com 20 e 30  $\mu$ M desse inibidor bloqueou as oscilações de cálcio em 100% dos oócitos (ZHANG et al., 2005). Em espermatozoides, o efeito dose-resposta pode ter sido influenciado ainda pela grande heterogeneidade da população espermática presente em um mesmo ejaculado, caracterizada pela presença de espermatozoides com diferentes padrões funcionais (CURRY, 2000).

A redução da motilidade espermática observada em algumas amostras tratadas com o U73122 no presente trabalho, sugere que a PLC participa da regulação da concentração do cálcio intracelular em espermatozoides ovinos, conforme demonstrado em outras espécies (HEYTENS et al., 2009; RICE et al., 2000; SPUNGIN; MARGALIT; BREITBART, 1995). Porém, os resultados do presente trabalho não permitem precisar a contribuição da regulação da atividade da enzima sobre a liberação do cálcio dos estoques citoplasmáticos e/ou o influxo desse íon através da membrana plasmática. Em mamíferos, a clivagem do PIP<sub>2</sub> pela PLC gera DAG, que atua sobre os canais de cálcio da membrana plasmática, e o IP<sub>3</sub>, o qual induz a liberação do cálcio armazenado no retículo endoplasmático (ABDEL-LATIF, 1991; BANERJEE; HASAN, 2005; TOMES; MCMASTER; SALING, 1996).

Márquez et al. (2007) demonstraram que a ativação da PLC pelo timerosal resultou na hiperativação de aproximadamente 90% dos espermatozoides de camundongos, induzida pela liberação dos estoques intracitoplasmáticos de cálcio. Porém, a continuidade desse padrão de

motilidade foi devida à manutenção das elevadas concentrações desse íon, mediada pelo influxo de cálcio, pela ativação dos canais de cálcio da membrana plasmática. A hiperativação é caracterizada por um batimento flagelar assimétrico e de maior amplitude, resultado de um grande aumento da concentração do cálcio intracelular (TURNER, 2006).

Rotem et al. (1990) demonstraram que a motilidade espermática está relacionada à ativação da PKC, induzida pelo aumento da concentração do DAG. Esses autores descreveram um aumento da motilidade de espermatozoides humanos de forma dose e tempo-dependentes, após incubação com um análogo do DAG, e também com o forbol-12--miristato-13-acetato (PMA), um ativador da PKC. Posteriormente, White et al. (2007) verificaram uma redução inicial da motilidade de espermatozoides de ouriço do mar quando esses gametas foram incubados com inibidores diretos da PKC, como queleritina e estaurosporina.

No presente trabalho a motilidade progressiva foi reduzida nas amostras tratadas com 20 e 30 $\mu$ M do U73122, no tempo de 0h. Porém nos tempos de 2 e 4h não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Esses resultados sugerem que o influxo do cálcio extracelular em espermatozoides ovinos também pode ser regulado por outros canais de cálcio, além dos canais voltagem dependentes, regulados pela PKC, o que poderia compensar a inibição da PLC pelo U73122, ou que a PKC é regulada por outros mecanismos além do DAG (ICKOWICZ; FINKELSTEIN; BREITBART, 2012).

A investigação do mecanismo de ação do U73122 é de difícil execução, pois o cálcio participa de várias funções celulares, o que demanda das células diferentes mecanismos de regulação deste íon. O melhor entendimento do seu efeito sobre as células pode ajudar na utilização deste inibidor em diluentes para criopreservação sêmen, a fim de se evitar a capacitação e a reação acrossomal prematuras.

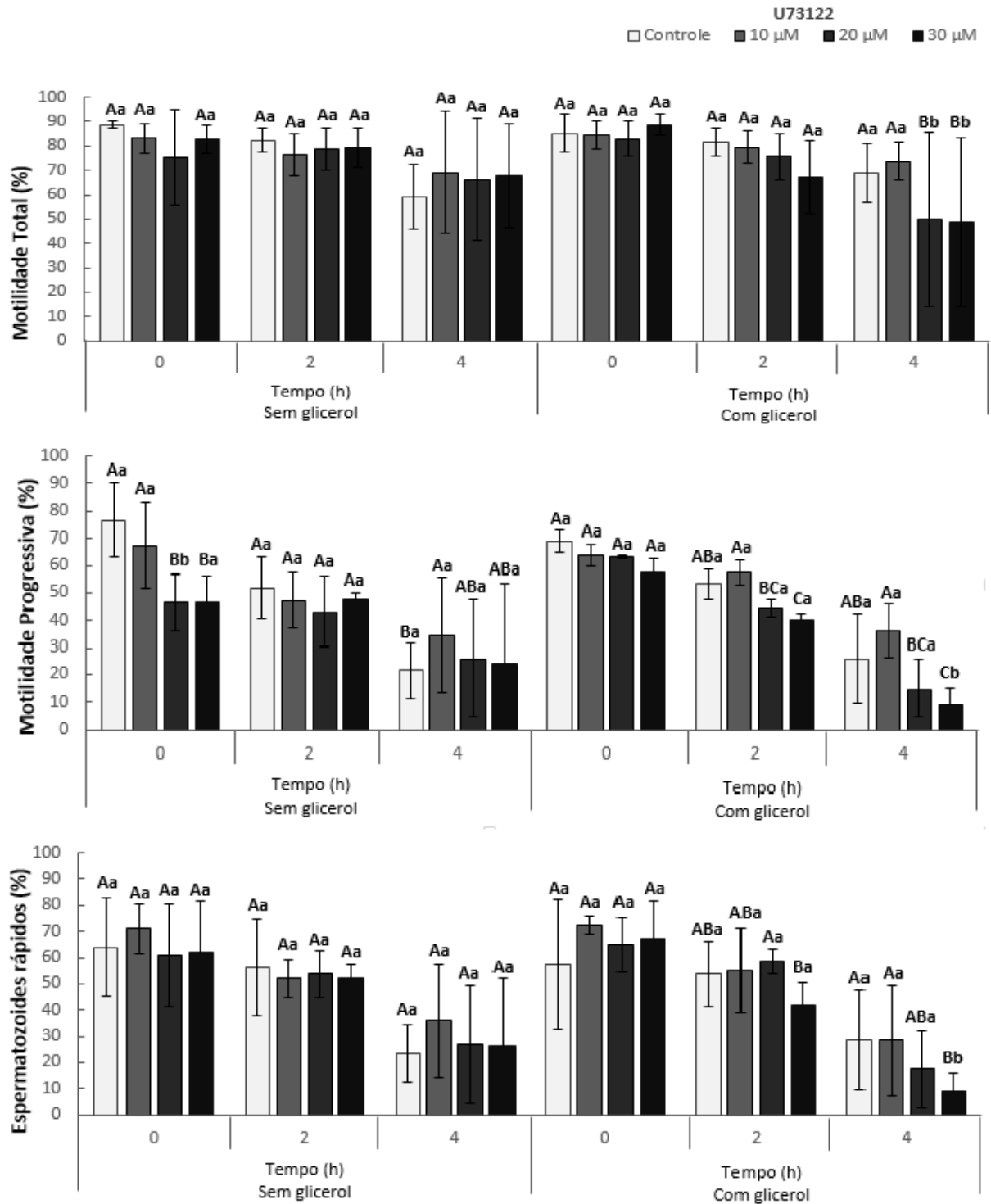
Nesta expectativa, a influência do glicerol sobre o uso de diferentes concentrações do U73122 foi aqui investigada, visto que este crioprotetor é um componente essencial para diluentes de criopreservação de sêmen de várias espécies, inclusive do sêmen ovino (BARBAS; MASCARENHAS, 2009; CURRY, 2000).

Os resultados deste trabalho mostraram que nas amostras mantidas em diluente com glicerol, avaliadas às 4h da incubação do sêmen *in natura*, as maiores concentrações do inibidor causaram uma redução da motilidade total, progressiva e espermatozoides com movimento rápidos ( $p < 0,05$ ), em relação às amostras tratadas com 10 $\mu$ M (Figura 5). Nessa concentração, o U73122 não reduziu os parâmetros físicos dos espermatozoides, em nenhum dos tempos utilizados neste estudo, nem pela presença ou ausência do glicerol em diluente, demonstrando que esta é uma concentração segura, e que pode ser utilizada em diluentes, na tentativa de reduzir a capacitação e a reação acrossomal prematura ocorridas durante a criopreservação.

Comparado aos resultados das amostras incubadas com o U73122 em diluente sem glicerol, é possível inferir que o referido crioprotetor potencializou a ação do inibidor sobre os espermatozoides ovinos (Figura 5).

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado em diluentes para o congelamento do sêmen ovino, porém seu potencial tóxico ainda não foi bem documentado nessa espécie. Em equinos, García et al. (2012) demonstraram que o glicerol afetou as membranas plasmáticas e mitocondriais, possivelmente devido a efeitos osmóticos e não osmóticos. Esses e outros efeitos foram marcantes quando o glicerol foi utilizado em concentrações acima de 3,5% nos diluentes de congelamento.

Essas ações tóxicas do glicerol podem ter colaborado para os resultados observados nas amostras tratadas com esse crioprotetor. Tais alterações de permeabilidade da membrana plasmática podem influenciar a regulação do cálcio intracelular, fato que está diretamente relacionado aos padrões de movimento dos espermatozoides não hiperativados, assim como durante a hiperativação (MARQUEZ; IGNOTZ; SUAREZ, 2007).



**Figura 5.** Efeito das diferentes concentrações do U73122 (0, 10, 20 ou 30µM), em diluentes com ou sem glicerol, sobre a motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e espermatozoides com movimentos rápidos (RAP) de amostras de sêmen ovino *in natura*. As avaliações foram realizadas à 0, 2 e 4h de incubação à 37°C. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem no mesmo tempo avaliado. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem entre os mesmos tempos em função da presença ou ausência do glicerol. Os percentuais médios de cada tratamento foram comparados usando o teste de médias DMS de Tukey, ao nível de significância de 5%.

## 4.2 Ensaio II

### Avaliação do efeito do U73122 sobre a congelabilidade do sêmen ovino

Tem sido demonstrado que o processo de criopreservação induz mudanças estruturais (RAMÓN et al., 2013) e de permeabilidade seletiva das membranas espermáticas, o que contribui para uma excessiva entrada de cálcio nas células. Essas alterações causam redução ou modificação dos padrões de motilidade dos espermatozoides descongelados (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000; WATSON, 2000)

No entanto, os resultados do presente estudo mostraram que o tratamento dos espermatozoides com o U73122 durante a criopreservação não afetou a cinética desses gametas, determinada após o descongelamento, utilizando o sistema CASA (Tabela 1).

Não foi possível identificar os motivos que levaram a ausência de diferença nos parâmetros cinéticos avaliados pelo sistema CASA. Uma sugestão é que, independentemente do tratamento com U73122, as células sofreram danos estruturais graves durante o congelamento (CURRY, 2000).

**Tabela 1.** Efeito da suplementação do U73122 em diluente de sêmen sobre a cinética de espermatozoides ovinos criopreservados.

Parâmetros	Unidade	Concentração de U73122		
		0 µM	10 µM	20 µM
MT	(%)	68,40 (±19,40) <sup>A</sup>	67,60 (±18,13) <sup>A</sup>	70,90 (±14,20) <sup>A</sup>
MP	(%)	31,04 (±19,43) <sup>A</sup>	31,10 (±15,18) <sup>A</sup>	31,10 (±14,44) <sup>A</sup>
RAP	(%)	21,96 (±15,97) <sup>A</sup>	22,43 (±12,18) <sup>A</sup>	20,11 (±11,34) <sup>A</sup>
MED	(%)	16,03 (±11,31) <sup>A</sup>	16,21 (±11,64) <sup>A</sup>	17,96 (±9,02) <sup>A</sup>
LEN	(%)	30,37 (±13,73) <sup>A</sup>	28,90 (±13,49) <sup>A</sup>	32,80 (±12,68) <sup>A</sup>
EST	(%)	31,60 (±20,18) <sup>A</sup>	32,43 (±18,25) <sup>A</sup>	29,10 (±14,09) <sup>A</sup>
VCL	(µm/s)	59,94 (±17,98) <sup>A</sup>	55,38 (±14,15) <sup>A</sup>	53,21 (±11,89) <sup>A</sup>
VSL	(µm/s)	44,60 (±21,37) <sup>A</sup>	41,10 (±16,06) <sup>A</sup>	38,31 (±14,07) <sup>A</sup>
VAP	(µm/s)	50,23 (±21,16) <sup>A</sup>	46,10 (± 16,01) <sup>A</sup>	43,35 (±14,05) <sup>A</sup>
LIN	(%)	71,15 (±15,03) <sup>A</sup>	71,85 (±13,99) <sup>A</sup>	69,52 (±12,57) <sup>A</sup>
STR	(%)	86,73 (±7,43) <sup>A</sup>	87,41 (±8,48) <sup>A</sup>	86,79 (±6,24) <sup>A</sup>
ALH	(%)	1,74 (±0,30) <sup>A</sup>	1,66 (±0,39) <sup>A</sup>	1,71 (±0,36) <sup>A</sup>
BCF	(%)	9,16 (±1,67) <sup>A</sup>	8,75 (±1,54) <sup>A</sup>	8,67 (±1,17) <sup>A</sup>
HYP	(%)	3,13 (±2,28) <sup>A</sup>	4,63 (±3,34) <sup>A</sup>	4,25 (±3,07) <sup>A</sup>

Motilidade total (MT), Motilidade progressiva (MP), Espermatozoides com deslocamento rápido (RAP), médio (MED), lentos (LEN) ou estáticos (EST), Velocidade curvilínea (VCL), Velocidade em linha reta (VSL), Velocidade de trajeto (VAP), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), Deslocamento de cabeça (ALH), Batimento/ frequência cruzada (BCF), Hiperatividade (HYP).

\* Médias (± DP) seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas variável não diferem entre si segundo o teste DMS  $P \leq 0,05$ .

As avaliações fluorescentes das amostras evidenciaram o efeito lesivo do congelamento sobre os espermatozoides, uma vez que a população de células PLALS (Quadro 2) foi encontrada em um percentual superior às demais. Nessa população, o tratamento dos espermatozoides com o U73122 durante o procedimento de congelamento do sêmen não influenciou os resultados ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2). Da mesma forma, o tratamento dos

espermatozoides com o inibidor da PLC não influenciou ( $p>0,05$ ) o percentual de células íntegras (PIAIC).

Diferenças significativas ( $p<0,05$ ) foram observadas nas populações PIALC e PIAIC, nas quais o percentual de células foi aumentado pelo tratamento das amostras com  $20\mu\text{M}$  do inibidor. No entanto, o impacto dessas populações no resultado final é muito pequeno devido ao baixo percentual de cada uma delas no total de células avaliadas (0,22 e 1,08%, respectivamente).

O tratamento das amostras com  $20\mu\text{M}$  do U73122 também causou uma redução significativa ( $p<0,05$ ) do percentual de células da população PLAIS em comparação com o controle (18,25 x 21,65%, respectivamente), porém tal redução contribuiu para aumentar o percentual de células PLALS, em detrimento da população PIAIC (Tabela 2). Esta observação revela que a utilização do U73122 parece causar danos nas membranas espermáticas, no entanto com 10 e  $20\mu\text{M}$  o uso do inibidor ainda se mostrou seguro.

A inibição da PLC, com conseqüente redução da concentração intracelular do DAG, pode contribuir para que haja aumento de lesões das membranas, uma vez verificado que o DAG torna as membranas espermáticas mais fluídas (GOLDBERG et al., 1994; SINGH et al., 2011), fato que está relacionado à maior resistência das células aos danos causados pela criopreservação (BLESBOIS; GRASSEAU; SEIGNEURIN, 2005; GIRAUD et al., 2000).

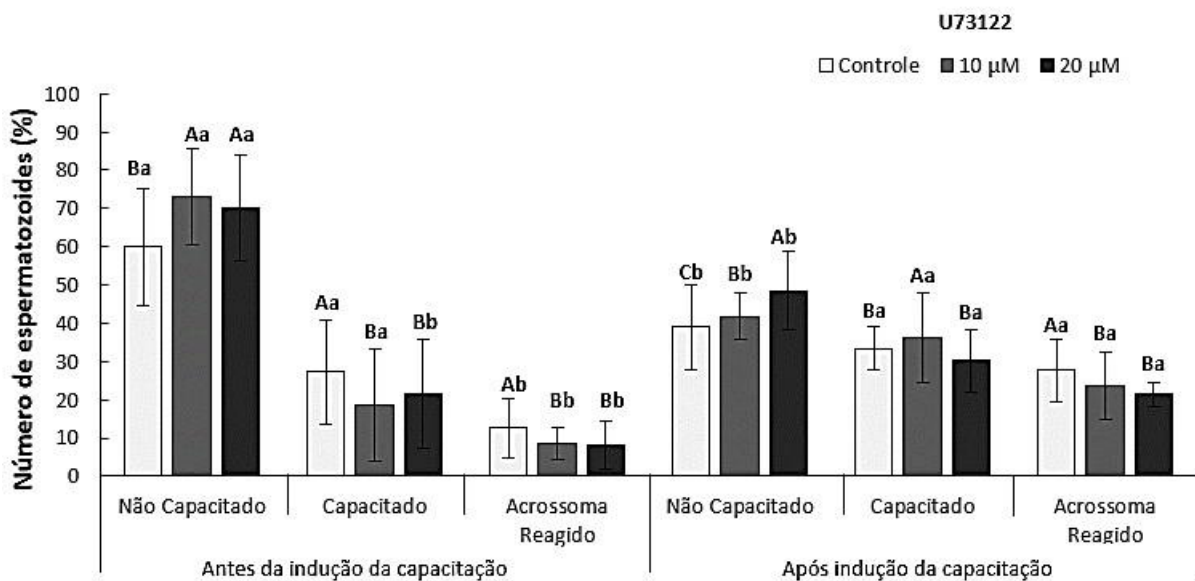
**Tabela 2.** Efeitos do U73122 durante a criopreservação de espermatozoides ovinos, na integridade das membranas plasmática e acrossomal, e atividade mitocondrial, determinadas pelas sondas fluorescentes iodeto de propídeo, PSA- FITC e JC-1.

Parâmetros	Unidade	Concentração de U73122		
		0 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$
PIAIC	(%)	28,88 ( $\pm 9,29$ ) <sup>A</sup>	28,84 ( $\pm 11,33$ ) <sup>A</sup>	24,56 ( $\pm 7,61$ ) <sup>A</sup>
PIAIS	(%)	1,32 ( $\pm 0,92$ ) <sup>A</sup>	1,17 ( $\pm 1,62$ ) <sup>A</sup>	1,49 ( $\pm 0,83$ ) <sup>A</sup>
PIALC	(%)	0,09 ( $\pm 0,27$ ) <sup>B</sup>	00,0 ( $\pm 00,0$ ) <sup>B</sup>	0,22 ( $\pm 0,29$ ) <sup>A</sup>
PIALS	(%)	0,14 ( $\pm 0,21$ ) <sup>B</sup>	0,32 ( $\pm 0,55$ ) <sup>B</sup>	1,08 ( $\pm 0,94$ ) <sup>A</sup>
PLAIC	(%)	4,00 ( $\pm 3,68$ ) <sup>A</sup>	2,75 ( $\pm 2,93$ ) <sup>A</sup>	4,27 ( $\pm 3,54$ ) <sup>A</sup>
PLAIS	(%)	21,65 ( $\pm 6,71$ ) <sup>A</sup>	20,91 ( $\pm 7,41$ ) <sup>AB</sup>	18,25 ( $\pm 6,05$ ) <sup>B</sup>
PLALC	(%)	0,94 ( $\pm 0,86$ ) <sup>A</sup>	2,38 ( $\pm 3,43$ ) <sup>A</sup>	2,81 ( $\pm 6,05$ ) <sup>A</sup>
PLALS	(%)	42,95 ( $\pm 11,08$ ) <sup>A</sup>	43,6 ( $\pm 10,47$ ) <sup>A</sup>	47,28 ( $\pm 8,61$ ) <sup>A</sup>

Membrana plasmática íntacta, Acrossoma íntacto e Com função mitocondrial (PIAIC); Membrana plasmática íntacta, Acrossoma íntacto e Sem função mitocondrial (PIAIS); Membrana plasmática íntacta, Acrossoma lesado e Com função mitocondrial (PIALC); Membrana plasmática íntacta, Acrossoma lesado e Sem função mitocondrial (PIALS); Membrana plasmática lesada, Acrossoma íntacto e Com função mitocondrial (PLAIC); Membrana plasmática Lesada, Acrossoma íntacto e Sem função mitocondrial (PLAIS); Membrana plasmática lesada, Acrossoma lesado e Com função mitocondrial (PLALC); Membrana plasmática lesada, Acrossoma lesado e Sem função mitocondrial (PLALS);

\* Médias ( $\pm$  DP) seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas de mesmo tempo por variável não diferem entre si segundo o teste DMS  $P\leq 0,05$ .

A suplementação do U73122 em diluente afetou os eventos de capacitação e reação acrossomal de espermatozoides ovinos criopreservados. As avaliações realizadas imediatamente após o descongelamento mostraram que o tratamento das amostras com 10 ou  $20\mu\text{M}$  do inibidor reduziu o percentual de espermatozoides capacitados e com acrossoma reagido, em relação ao controle (Figura 6), porém não foram observadas diferenças ( $p>0,05$ ) entre os grupos tratados com as duas concentrações do inibidor avaliadas.



**Figura 6.** Efeito das diferentes concentrações do U73122 (0, 10, 20μM) em diluente sobre o número de espermatozoides não capacitados (NC), capacitados (C) ou com acrossoma reagido (AR) de amostras de sêmen ovino criopreservadas. As avaliações foram realizadas antes e após a indução da capacitação *in vitro*, onde as células foram incubadas durante 4h à 37°C. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem na mesma categoria avaliada (NC, C ou AR). Médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem entre as mesmas categorias avaliadas antes e após a indução da capacitação. Os percentuais médios de cada tratamento foram comparados usando o teste de médias DMS de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Ainda que os processos de capacitação e reação acrossomal ocorram de maneiras diferentes nos ambientes *in vivo* ou *in vitro* (OLMO et al., 2016), a indução da capacitação *in vitro* utilizada no presente estudo, permitiu investigar a reversibilidade dos efeitos do inibidor sobre a capacitação e reação acrossomal dos espermatozoides ovinos criopreservados. Ao comparar as amostras antes e após a capacitação, foi verificado, em todos os tratamentos, que a indução da capacitação promoveu uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) do percentual de espermatozoides não capacitados, assim como um aumento do percentual de espermatozoides com acrossoma reagido (Figura 6). O percentual de espermatozoides capacitados também aumentou após a indução da capacitação no grupo tratado com 20μM de U73122, entretanto esse parâmetro não foi alterado ( $p > 0,05$ ) no grupo tratado com 10μM do inibidor.

Após a indução da capacitação, as amostras do grupo controle foram as que apresentaram maior percentual de espermatozoides com acrossoma reagido, o que demonstra o efeito positivo do U73122 em evitar a reação acrossômica prematura, induzida pela criopreservação (Figura 6).

O efeito da criopreservação sobre o estado de capacitação foi observado por Gillan et al. (1997) ao analisarem sêmen ovino *in natura* e criopreservado. Amostras de sêmen *in natura* apresentaram 54% de espermatozoides capacitados e 41% com acrossoma reagido, enquanto os criopreservados tinham 65,9% de espermatozoides capacitados e 64,2% com acrossoma reagido.

Até o momento não existem informações na literatura sobre um percentual ideal de espermatozoides no estado não capacitado para que uma amostra de sêmen criopreservado seja considerada adequada para inseminação. No entanto, sabe-se que o processo de capacitação, assim como o de reação acrossomal, deve acontecer no trato reprodutivo da fêmea (FRASER,

2010) de forma que amostras espermáticas com maior percentual de espermatozoides no estado não capacitado, após o descongelamento, possuem maiores chances de fertilizar o ócito (CUMMINS et al., 1991).



## 5. CONCLUSÕES

- A suplementação do inibidor U73122 em diluentes de sêmen pode ser feita na concentração de 10 $\mu$ M sem prejuízos a cinética dos espermatozoides ovinos in natura.
- A suplementação do inibidor U73122 em diluente, nas concentrações de 10 ou 20  $\mu$ M não altera a a cinética de espermatozoides ovinos submetidos a criopreservação.
- A suplementação do inibidor U73122 em diluente, nas concentrações de 10 ou 20  $\mu$ M não altera a integridade das membranas espermáticas durante a criopreservação.
- A utilização do inibidor U73122 em diluente, na concentração de 10 ou 20  $\mu$ M previne a capacitação prematura e antecipação da reação acrossomal em espermatozoides ovinos criopreservados.
- A ação do inibidor U73122 sobre os processos a capacitação e reação acrossomal, nas concentrações de 10 e 20  $\mu$ M de espermatozoides ovinos criopreservados é reversível.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATIF, A. T. A. A. Biochemical and functional interactions between the inositol 1,4,5 - trisphosphate - calcium and cyclic amp signalling systems in smooth muscle. **Cellular Signalling**, v. 3, p. 371–385, 1991.

ALASMARI, W. et al. Copyright 2013 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. **American Society for biochemistry and Molecular biology**, p. 1–23, 2013.

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA After 25 Years. v. 25, n. 3, p. 317–325, 2004.

ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática : momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 145–151, 2011.

BABA, D. et al. Mouse Sperm Lacking Cell Surface Hyaluronidase PH-20 Can Pass through the Layer of Cumulus Cells and Fertilize the Egg \*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 33, p. 30310–30314, 2002.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J.-F.; CORMIER, N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals : A Damaging and Capacitating Phenomenon Minireview. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 7, 2000.

BALDI, E. et al. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 110–123, 2000.

BANERJEE, S.; HASAN, G. The InsP 3 receptor : its role in neuronal physiology and neurodegeneration. **BioEssays**, v. 27, p. 1035–1047, 2005.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine International**, p. 7, 2011.

BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank**, v. 10, p. 49–62, 2009.

BIN, A. et al. Replacing chicken yolk with yolks from other sources in ram semen diluents and their effects on fertility in vitro. **Small Ruminant Research**, v. 113, p. 405–410, 2013.

BLEASDALE, J. E. et al. Selective Inhibition of Receptor-Coupled Phospholipase Dependent Processes in Human Platelets and Polymorphonuclear Neutrophils C-. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 255, p. 756–768, 1990.

BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I.; SEIGNEURIN, F. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. **Reproduction**, v. 129, p. 371–378, 2005.

BREITBART, H. Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 151–159, 2002a.

- BREITBART, H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 139–144, 2002b.
- BREITBART, H.; COHEN, G.; RUBINSTEIN, S. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. **Reproduction**, v. 129, p. 263–268, 2005.
- BREITBART, H.; ETKOVITZ, N. Role and regulation of EGFR in actin remodeling in sperm capacitation and the acrosome reaction. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 106–110, 2011.
- BREITBART, H.; FINKELSTEIN, M. Regulation of sperm capacitation and the acrosome reaction by PIP 2 and actin modulation. **Asian Journal of Andrology**, p. 597–600, 2015.
- BREITBART, H.; RUBINSTEIN, S.; LAX, Y. Regulatory mechanisms in acrosomal exocytosis. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 165–174, 1997.
- BRENER, E. et al. Remodeling of the Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Capacitation and Acrosome Reaction 1. **Biology of Reproduction**, v. 845, p. 837–845, 2003.
- BRENKER, C. et al. The CatSper channel : a polymodal chemosensor in human sperm. **European Molecular Biology Organization**, v. 31, n. 7, p. 1654–1665, 2012.
- CBRA (ED.). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen de animal**. 3. ed. Belo Horizonte: [s.n.].
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes [. **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 536–543, 2010.
- CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. [s.l.] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- CORDELLI, E. et al. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. **Contraception**, v. 72, p. 273–279, 2005.
- CORREIA, J.; MICHELANGELI, F.; PUBLICOVER, S. Regulation and roles of Ca<sup>2+</sup> stores in human sperm. **Reproduction**, v. 150, p. 65–76, 2015.
- CUMMINS, JAMES M. et al. A Test of the Human Ionophore Acrosome Reaction Followig Ionophore Challenge. **Jounal of andrology**, v. 12, 1991.
- CUNHA, A. T. M.; CARVALHO, J. O.; DODE, M. A. N. Techniques for sperm evaluation using fluorescent probes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, p. 4365–4376, 2015.
- CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Journals Reproduction and fertility**, v. 5, p. 46–52, 2000.

DARIN-BENNETT, A.; WHITTE, I. . Influence of the Cholesterol Content of Mammalian Spermatozoa on Susceptibility to Cold-Shock. **Cryobiology**, v. 14, p. 466–470, 1977.

ETKOVITZ, N. et al. Role of PI3-Kinase and PI4-Kinase in Actin Polymerization During Bovine Sperm. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 263–273, 2007.

FANG, Y. et al. Effects of astaxanthin supplementation on the sperm quality and antioxidant capacity of ram semen during liquid storage. **Small Ruminant Research**, v. 130, p. 178–182, 2015.

FERNANDES, L. C. **Calcium Mobilisation in Human Sperm and its Effects on Mobility**. [s.l.] Universidade de Coimbra, 2012.

FILHO, D. W. Oxigênio, radicais livres de oxigênio e saúde. **Biotemas**, v. 7, p. 7–18, 1994.

FINKELSTEIN, M. et al. Regulation of sperm motility by PIP 2 ( 4 , 5 ) and actin polymerization. **Developmental Biology**, v. 381, p. 62–72, 2013.

FORERO- GONZALEZ, R. . et al. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma , acrosomal and mitochondrial membranes. **First International Journal of Andrology**, v. 44, p. 154–159, 2012.

FRASER, L. R. The ““ Switching on ”” of Mammalian Spermatozoa : Molecular Events Involved in Promotion and Regulation of Capacitation. **Molecular Reproduction and development**, v. 77, p. 197–208, 2010.

FRASER, L. R.; ABEYDEERA, L. R.; NIWA, K. Mechanisms That Modulate Bull Sperm Capacitation and Acrosomal Exocytosis as Determined by Chlortetracycline Analysis. **Molecular Reproduction and development**, v. 40, p. 233–241, 1995.

GARCÍA, B. M. et al. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa : Effects on membrane integrity and cytoskeleton , lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. **Theriogenology**, v. 77, p. 1280–1289, 2012.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen–thawed ram spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 481–487, 1997.

GIRAUD, M. N. et al. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, n. 10, p. 2160–2164, 2000.

GOLDBERG, E. M. et al. Effects of Diacylglycerols and Ca<sup>2+</sup> + on Structure of Phosphatidylcholine / Phosphatidylserine Bilayers. **Biophysical Journal**, v. 66, p. 382–393, 1994.

GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; CORBALÁN- GARCÍA, S. Diacylglycerols , multivalent membrane modulators. **Chemistri and Physics of Lipids**, v. 148, p. 1–25, 2007.

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

GRAHAM, J. K.; MOCE, E. Fertility evaluation of frozen / thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 492–504, 2005.

GRASA, P.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUINÑO-BLANCO, T. Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. **Reproduction**, v. 132, p. 721–732, 2006.

HEYTENS, E. et al. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC z) in spermatozoa from infertile men. **Andrology**, v. 24, n. 10, p. 2417–2428, 2009.

HILDEBRAND, M. S. et al. Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, n. July, p. 1178–1184, 2010.

HO, H.; SUAREZ, S. S. An Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor-Gated Intracellular Ca<sup>2+</sup> Store Is Involved in Regulating Sperm Hyperactivated Motility 1. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1606–1615, 2001.

HORVATH, G.; SEIDEL, G. E. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-β-cyclodextrin. **Theriogenology**, v. 66, p. 1026–1033, 2006.

IBGE. **Produção da Pecuária Mundial**. Rio de Janeiro: [s.n.]. v. 32

IBGE. **Produção da Pecuária Mundial**. Rio de Janeiro: [s.n.]. v. 42

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

ISACHENKO, E. et al. Article Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. **Reproductive Biomedicine**, v. 6, n. 2, p. 191–200, 2003.

KIRK, E. S. **Flow cytometric evaluation of stallion sperm**. [s.l.] Colorado State University, 2001.

KUMAR, D.; MOHAMMED, S.; NAQVI, K. Effect of time and depth of insemination on fertility of Bharat Merino sheep inseminated trans-cervical with frozen-thawed semen. **Journal of Animal Science and technology**, v. 56, p. 1–6, 2014.

KURODA, Y. et al. Are there inositol 1,4, s-triphosphate in human sperm? **Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. 135–143, 1999.

LINDEMANN, C. B.; KANOUS, K. S. Regulation of mammalian sperm motility. **Andrology**, v. 22, p. 1–22, 1989.

LOUX, S. C. et al. CatSper and the Relationship of Hyperactivated Motility to Intracellular Calcium and pH Kinetics in Equine Sperm 1. **Biology of Reproduction**, v. 89, n. 5, p. 1–15, 2013.

LUNA, C. et al. Theriogenology Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm – zona pellucida interaction. **Theriogenology**, v. 83, p. 670–678, 2015.

MACMILLAN, D.; MCCARRON, J. The phospholipase C inhibitor U-73122 inhibits Ca<sup>2+</sup> release from the intracellular sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store by inhibiting Ca<sup>2+</sup> pumps in Abbreviations : **British journal of pharmacology**, v. 160, p. 1295–1301, 2010.

MARQUEZ, B.; IGNOTZ, G.; SUAREZ, S. S. Contributions of extracellular and intracellular Ca<sup>2+</sup> to regulation of sperm motility : Release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm. **Developmental Biology**, v. 303, p. 214–221, 2007.

MARQUEZ, B.; SUAREZ, S. S. Bovine Sperm Hyperactivation Is Promoted by Alkaline-Stimulated Ca<sup>2+</sup> Influx 1. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 660–665, 2007.

MARTECIKOVA, S. et al. Effect of acrosome reaction progress in frozen-thawed boar spermatozoa on the efficiency of in vitro oocyte fertilization. **Veterinari Medicine**, v. 55, n. 9, p. 429–437, 2010.

MEDEIROS, C. M. O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327–344, 2002.

MIKOSHIBA, K. IP<sub>3</sub> receptor / Ca<sup>2+</sup> channel : from discovery to new signaling concepts. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, p. 1426–1446, 2007.

MOCÉ, E.; PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 100, p. 236–247, 2010.

MOEL, M. P. D. E. et al. Effect of the aminosteroid , U73122 , on Ca<sup>2+</sup> uptake and release properties of rat liver microsomes. **European Journal of Biochemistry**, v. 631, p. 626–631, 1995.

MOORE, K. .; PERSAUD, T. V. . **Embriologia Básica**. 6° edição ed.Rio de Janeiro: Elsevier Inc, 2004.

MORTIMER, S. T.; MAXWELL, W. M. C. Kinematic definition of sperm hiperactivation. **Reproduction Fertility and Development**, v. 11, p. 25–30, 1999.

MOTAMEDI- MOJDEHI, R.; ROOSTAEI-ALI MEHR, M.; RAJABI- TOUSTANI, R. Effect of Different Levels of Glycerol and Cholesterol-Loaded Cyclodextrin on Cryosurvival of Ram Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 65–70, 2014.

MUKHERJEE, K. P. et al. Cryoprotective effect of EDTA , lactose , ascorbic acid and L-cysteine as additives on garole ram ( *Ovis aries* ) semen. **International Journal of Advanced Reserch in Biological Sciences**, v. 3, n. 7, p. 92–98, 2016.

NAKANO, T.; KYOZUKA, K. Soluble sperm extract specifically recapitulates the initial phase of the Ca<sup>2+</sup> response in the fertilized oocyte of *P. ocellata* following a G-protein / PLC<sup>β</sup> signaling pathway. **Zygote**, p. 1–15, 2014.

OKADA, A. et al. Cryopreservation-induced acrosomal vesiculation in live spermatozoa from cynomolgus monkeys ( *Macaca fascicularis* ). **Human Reproduction**, v. 16, n. 10, p. 2139–2147, 2001.

OLMO, E. DEL et al. Theriogenology Estrous sheep serum enables in vitro capacitation of ram spermatozoa while preventing caspase activation. **Theriogenology**, v. 85, p. 351–360, 2016.

PARODI, J. Motility, viability, and calcium in the sperm cells. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 60, n. 2, p. 65–71, 2014.

PARRINGTON, J. et al. Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa : Potential components of the sperm factor that causes Ca<sup>2+</sup> release in eggs Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa : **Reproduction**, v. 123, p. 31–39, 2002.

PARTYKA, A.; NI, W. Methods of Assessment of Cryopreserved Semen. **Current Frontiers in Cryobiology**, p. 575, 2012.

PATRAT, C.; SERRES, C.; JOUANNET, P. The acrosome reaction in human spermatozoa. **Biology of the cell**, v. 92, p. 255–266, 2000.

PELUFO, V. et al. Theriogenology Effects of glycerol and sugar mixing temperature on the morphologic and functional integrity of cryopreserved ram sperm. **Theriogenology**, v. 83, p. 144–151, 2015.

PÉREZ, L. . et al. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v. 46, p. 131–140, 1996.

PIERAZOLI, G. F.; CAMPOS, L. P. DE P. M. **O USO DE ADITIVOS NA MANIPULAÇÃO DE SÊMEN NOS ANIMAIS DOMÉSTICOS ( REVISÃO DE LITERATURA )**. [s.l.] Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 2013.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of Spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 1, 1949.

PURDY, P. H. et al. The fertility of ram sperm held for 24 h at 5 ° C prior to cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 4320, n. 09, p. 9–10, 2016.

QI, H. et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. **PNAS**, v. 104, n. 4, p. 1219–1223, 2007.

RAHMAN, S.; KWON, W.; PANG, M. Calcium Influx and Male Fertility in the Context of the Sperm Proteome : An Update. **Biomed Research international**, p. 13, 2014.

RAMÓN, M. et al. Sperm Cell Population Dynamics in Ram Semen during the Cryopreservation Process. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. 1–8, 2013.

RAMU, S.; JEYENDRAN, R. S. The Hypo-osmotic Swelling Test for Evaluation of Sperm Membrane Integrity. **Methods in molecular Biology**, v. 927, p. 21–25, 2013.

RASUL, Z.; AHMED, N.; ANZAR, M. Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glycerol during cryopreservation of buffalo sperm. **Theriogenology**, v. 68, p. 813–819, 2007.

- REN, D. et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. **Nature**, v. 413, p. 603–609, 2001.
- RICE, A. et al. Mammalian Sperm Contain a  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitive Phospholipase C Activity That Can Generate  $\text{InsP}_3$  from  $\text{PIP}_2$  Associated with Intracellular Organelles. **Developmental Biology**, v. 228, p. 125–135, 2000.
- ROBAYO, I.; MONTENEGRO, V.; VALDE, C. CASA Assessment of Kinematic Parameters of Ram Spermatozoa and their Relationship to Migration Efficiency in Ruminant Cervical Mucus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 399, p. 393–399, 2008.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory Semen Assessment and Prediction of Fertility : still Utopia ?\* Outcomes from Routine Laboratory Sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 318, p. 312–318, 2003.
- ROLDAN, E. R. .; SHI, Q. . Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, n. 6, p. 89–104, 2007.
- ROLDAN, E. R. S. ROLE OF PHOSPHOLIPASES DURING SPERM ACROSOMAL EXOCYTOSIS. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. 1109–1119, 1998.
- ROTEM, R. et al. Protein kinase C is present in human sperm : Possible role in flagellar motility. **cell biology**, v. 87, p. 7305–7308, 1990.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 77–111, 2000.
- SALICIONI, A. et al. Signalling pathways involved in sperm capacitation . PubMed Commons. **Journals Reproduction and fertility**, v. 65, p. 245–59, 2016.
- SANGEETA, S. et al. Role of amino acids as additives on sperm motility , plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 161, p. 82–88, 2015.
- SARLÓS, P. et al. COMPARATIVE EVALUATION OF THE EFFECT OF ANTIOXIDANTS IN THE CONSERVATION OF RAM SEMEN. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, n. 2, p. 235–245, 2002.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958–978, 2006.
- SINGH, A. P.; RAJENDER, S. CatSper channel , sperm function and male fertility. **Reproductive Biomedicine**, 2014.
- SINGH, V. K. et al. Assessment of Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  , cAMP and 1 , 2-Diacylglycerol in Cryopreserved Buffalo ( *Bubalus bubalis* ) Spermatozoa on Supplementation of Taurine and Trehalose in the Extender. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 1–7, 2011.



SMITH, R. J et al. Receptor-Coupled Signal Transduction in Human Polymorphonuclear Neutrophils : Effects of a Novel Inhibitor of Phospholipase Processes on Cell Responsiveness are. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 253, p. 688–697, 1990.

SPUNGIN, B.; MARGALIT, I.; BREITBART, H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system : evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 2525–2535, 1995.

SUAREZ, S. S.; HO, H. Hyperactivated Motility in Sperm Introduction : Functions of Hyperactivation Initiation of Hyperactivation In Vivo. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 124, p. 119–124, 2003.

TANPHAICHITR, N. et al. Remodeling of the plasma membrane in preparation for sperm – egg recognition : roles of acrosomal proteins. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, p. 574–582, 2015.

TOMES, CLAUDIA N; MCMASTER, C. R.; SALING, PATRICIA M. Activation of Mouse Sperm Phosphatidylinositol-4 , 5 Bisphosphate-Phospholipase C by Zona Pellucida Is Modulated by Tyrosine Phosphorylation. **Molecular Reproduction and development**, v. 43, p. 196–204, 1996.

TSAKMAKIDIS, I. A. Ram semen evaluation : Development and efficiency of modern. **Small Ruminant Research**, v. 92, n. 1-3, p. 126–130, 2010.

TURNER, R. M. Moving to the beat : a review of mammalian sperm motility regulation. **Reproduction Fertility and Development**, v. 18, p. 25–38, 2006.

VAZQUEZ-LEVIN, M. et al. AN OVERVIEW OF THE PROACROSIN / ACROSIN SYSTEM IN HUMAN SPERMATOOZOA. **Endocrinologia molecular**, v. 56, p. 59–74, 2005.

VERSTEGEM, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer Assisted Semen Analyzers in Andrology Reserach and Veterinary Practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149–179, 2002.

WALENSKY, L. D; SNYDER, S. H. Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors Selectively Localized to the Acrosomes of Mammalian Sperm. **Journal of Cell Biology**, v. 130, n. 4, p. 857–869, 1995.

WASSARMAN, P. M.; GUSTAVE, O.; PLACE, L. L. Mammalian Fertilization : Molecular Aspects of Gamete Adhesion , Exocytosis , and Fusion. **Cell**, v. 96, p. 175–183, 1999.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, p. 481–492, 2000.

WHITE, D.; LAMIRANDE, E. DE; GAGNON, C. Protein kinase C is an important signaling mediator associated with motility of intact sea urchin spermatozoa. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 4053–4064, 2007.

WITTE, T. S.; SCHAFER- SOMI, S. Involvement of cholesterol , calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 102, p. 181–193, 2007.

WOLKERS, W. F.; WALKER, J. M. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. Hannover: [s.n.].

WU, H. et al. Sperm Factor Induces Intracellular Free Calcium Oscillations by Stimulating the Phosphoinositide Pathway 1. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1338–1349, 2001.

YANAGIMACHI, R. Mammalian Sperm Acrosome Reaction : Where Does It Begin Before Fertilization ? **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 4–5, 2011.

YÁNIZ, J. LUIS et al. Effect of diluent composition on the dynamics of sperm DNA fragmentation and other sperm quality parameters in ram during incubation at 37 ° C. **Small Ruminant Research**, v. 129, p. 92–96, 2015.

ZHANG, D. et al. Strontium promotes calcium oscillations in mouse meiotic oocytes and early embryos through InsP3 receptors , and requires activation of phospholipase and the synergistic action of InsP3. **Human Reproduction**, v. 20, n. 11, p. 3053–3061, 2005.

## ANEXO I

### LISTA DE REAGENTES

**Ácido Láctico 98%** (Código L4263) – Sigma Aldrich  
**Álcool Polivinílico** - (Código P8136) – Sigma Aldrich

**Botubov®** Fração I - (sem código) – Botupharma  
**Botubov®** Fração única - (sem código) - Botupharma  
**BSA Fração V** (Código A9418) – Sigma Aldrich

**CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O** (Código C3881) – Sigma Aldrich  
**CTC** (Código C4881) – Sigma Aldrich

**DABCO** (Código D2522) – Sigma Aldrich  
**DMSO** - (Código D2650) – Sigma Aldrich

**Estreptomicina** (Código 1277) – Sigma Aldrich

**FITC- PSA** (Código L0770) – Sigma Aldrich

**H<sub>2</sub>O** (Ultra pura Código UNI-H<sub>2</sub>O)  
**Hepes** (Código H4034) – Sigma Aldrich

**JC1** (Código T4069) – Sigma Aldrich

**KCl** (Código P5405) – Sigma Aldrich  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** (Código P5655) – Sigma Aldrich

**L- Cisteína** (Código C7477) – Sigma Aldrich

**MgCl<sub>2</sub>. 6 H<sub>2</sub>O** (Código M0250) – Sigma Aldrich

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** - (Código S0876) - Sigma Aldrich  
**NaCl** (Código S5886) – Sigma Aldrich  
**NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>** (Código S0751) – Sigma Aldrich  
**NaHCO<sub>3</sub>** (Código S6297) – Sigma Aldrich

**Penicilina** (Código 3032) – Sigma Aldrich

**Vermelho de fenol** (Código 6297) – Sigma Aldrich  
**Piruvato de sódio** (Código P4562) – Sigma Aldrich  
**Propidium iodide - IP** - (código P4170) – Sigma Aldrich

**Tris** (Código T1503) – Sigma Aldrich

**U73122-** (código U6756) – Sigma Aldrich

## ANEXO II

### PREPARAÇÃO DE MEIOS

#### 1. MEIO PBS (livre de $\text{Ca}^{2+}$ e $\text{Mg}^{2+}$ )

▪ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (Sigma S0876) .....	0,115 g
▪ NaCl (Sigma S5886) .....	0,8 g
▪ KCl (Sigma P5405) .....	0,02 g
▪ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Sigma P5655) .....	0,02 g
▪ Água Mili Q .....	10 mL (qsp)

*Obs: pH e osmolaridade próximos a 7,2 e 280 mOsm/kg respectivamente; armazenar a 5°C*

#### 2. MEIO U73122

##### Solução trabalho / uso (2,2 mM)

▪ U73122 (Sigma U6756) .....	5 mg
▪ DMSO (Sigma D2650) .....	4,9 mL

*Obs: aquecer a 40 ° C em banho- maria até diluir todo soluto*

#### 3. MEIOS PARA AVALIAÇÃO DAS MEMBRANAS (CELEGHINE, 2005)

##### 3.1 Iodeto De Propídeo (IP)

##### Solução estoque (25mg/mL)

▪ IP (Sigma P4170) .....	25 mg
▪ DMSO (Sigma D2650) .....	1,0 mL

##### Solução trabalho (0,5 mg/mL)

▪ Solução estoque de IP .....	20µL
▪ PBS (solução estoque) .....	980,0 µL

*Obs: aliquotar as soluções de trabalho e manter congeladas e protegidas de luz*

##### Solução uso

▪ Solução trabalho de IP .....	5 µL
▪ PBS (solução estoque) .....	295 µL

*Obs: Preparar apenas no dia da utilização*

### **3.1. FICT- PSA**

#### **Solução trabalho/uso (100µg/ mL)**

- FITC- PSA (Sigma L0770) ..... 2 mg
- PBS ..... 20 mL

*Obs: aliquotar a solução de trabalho e manter refrigerado a 4°C protegidas de luz*

### **3.2 JC-1**

#### **Solução estoque (5mg/ mL)**

- JC1 (Sigma T4069) ..... 5 mg
- DMSO (Sigma D2650) ..... 1 mL

#### **Solução trabalho/uso (153 µM)**

- Solução estoque de JC1 ..... 10 µL
- DMSO (Sigma D2650) ..... 490 µL

*Obs: aliquotar a solução de trabalho e manter congeladas e protegidas de luz*

## **4. MEIOS PARA AVALIAÇÃO DA CAPACITAÇÃO/ REAÇÃO ACROSSOMAL**

### **4.1. Tris**

#### **Solução estoque (20 mM)**

- Tris (Sigma T1503) ..... 0,0242 g
- Água Mili Q ..... 10 mL

*Obs: aliquotar a solução de trabalho e manter congeladas*

### **4.2. NaCl**

#### **Solução estoque (130 mM)**

*Obs: aliquotar a solução de trabalho e manter congeladas*

▪ NaCl (Sigma S5886) .....	0,0759 g
▪ Água Mili Q .....	10 mL

#### 4.3 Meio Clortetraciclina (CTC)

▪ Tris (Solução estoque) .....	3mL
▪ NaCl (Solução estoque) .....	3mL
▪ L- Cisteína (Sigma C7477) .....	1,8 mg
▪ CTC (Sigma C4881) .....	1,16 mg

*Obs: Preparar no momento da utilização e usar no período máximo de 3 horas.*

#### 4.4 DABCO

##### Solução estoque

▪ DABCO (Sigma D2522) .....	0,247 g
▪ PBS (Solução estoque) .....	10 mL (qsp)

*Obs: pH próximo a 7,4; aliquotar a solução de trabalho e manter congeladas*

### 5. MEIOS PARA INDUÇÃO DA CAPACITAÇÃO *IN VITRO*

#### 5.1 TALP SP (Solução estoque)

▪ NaCl (Sigma S5886) .....	0,5844 g
▪ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma S0751) .....	0,0036 g
▪ KCl (Sigma P5405) .....	0,0230 g
▪ Ácido Lático 98% (Sigma L4263) .....	186 µL
▪ Hepes (Sigma H4034) .....	0,2382 g
▪ NaHCO <sub>3</sub> (Sigma S6297) .....	0,2100 g
▪ CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O (Sigma C3881) .....	0,0294 g
▪ MgCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O (Sigma M0250) .....	0,0080 g
▪ Penicilina (Sigma P3032) .....	6,8 mg
▪ Estreptomicina (Sigma S01277) .....	10 mg
▪ Água Mili Q .....	100 mL (qsp)

*Obs: pH e osmolaridade mantidos em 7,2 e 280 mOsm/ kg; Esterilizar por filtração e estocar a 4°C por 15- 20 dias*

#### 5.2 TALP SP (Solução uso)

*Obs: Para indução da capacitação in vitro foi acrescentado 0,0 2mg de heparina (Sigma H3149) para 10 mL de Talp sp uso*

▪ Talp <i>sp</i> (Solução estoque) .....	10 mL
▪ BSA Fração V (Sigma A9418) .....	0,06 g
▪ Penicilina (Sigma 3032) .....	0,68 mg
▪ Estreptomicina (Sigma S1277) .....	1 mg

### 5.3 TALP – 10 X (solução estoque)

▪ NaCl (Sigma S5886) .....	2,7 g
▪ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma S0751) .....	0,024 g
▪ NaHCO <sub>3</sub> (Sigma S6297) .....	1,05 g
▪ KCl (Sigma P5405) .....	0,117 g
▪ Ácido láctico 98% (Sigma L4263) .....	1133 µL
▪ Piruvato de sódio (Sigma P4562) .....	0,55 g
▪ Hepes (Sigma H4034) .....	1,19 g
▪ MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O (Sigma S0751) .....	0,155g
▪ Phenol Red (Sigma 6297) .....	0,001g
▪ Penicilina (Sigma P5405) .....	0,34 mg
▪ Estreptomicina (Sigma 1277) .....	5 mg
▪ Água Mili Q .....	50 mL (qsp)

*Obs: pH e osmolaridade mantidos em 7,2 e 280 mOsm/ kg; Esterilizar por filtração e estocar a 4°C por 15- 20 dias*

### 5.4 MINI PERCOLL

#### 5.4.1 Percoll 90 %

▪ Percoll (Sigma P4937).....	540µL
▪ Talp 10 X (Solução estoque) .....	60 µL

#### 5.4.2 Percoll 45 %

▪ Percoll 90% .....	400 µL
▪ Talp – sp (Solução uso) .....	200 µL

#### 5.4.3 Preparo do gradiente de mini Percoll

▪ Percoll 90 % .....	400 µL
▪ Percoll 45 % .....	400 µL

*Obs: Em um microtubo acrescentar muito lentamente o Percoll 45 % sobre o Percoll 90 %;*

### ANEXO III

**Tabela 3.** Análise da variância dos parâmetros de qualidade espermática avaliados durante o Teste de Termorresistência (TTR) do sêmen in natura submetido a várias s concentrações de 0, 10, 20 e 30  $\mu$ M do inibidor U73122.

FV	Quadrado Médio (%)						
	GL	MT	MP	RAP	MED	LEN	EST
<b>Tempo (T)</b>	2	3713,64*	11418,46*	13824,53*	4063,25*	91,95*	2122,128 <sup>ns</sup>
<b>Glicerol (G)</b>	1	83,44*	0,51*	168,01*	14,64*	202,71*	31,51 <sup>ns</sup>
<b>Concentração de inibidor (C)</b>	3	269,47 <sup>ns</sup>	1153,68*	351,95 <sup>ns</sup>	84,89*	98,19*	221,44 <sup>ns</sup>
<b>T X G</b>	2	139,00*	184,14 <sup>ns</sup>	143,22*	7,05*	38,44 <sup>ns</sup>	202,90 <sup>ns</sup>
<b>T X C</b>	6	122,82*	160,90 <sup>ns</sup>	132,27*	160,34*	56,94*	210,38 <sup>ns</sup>
<b>G X C</b>	3	173,98*	56,65*	69,53*	228,76*	48,96*	200,53 <sup>ns</sup>
<b>Resíduo</b>	78	240	157	241	234,48	36	275
<b>C.V.(%):</b>		15	20	56	33	51	29

Motilidade total (MT), Motilidade progressiva (MP), Espermatozoides com deslocamento rápido (RAP), médio (MED), lentos (LEN) ou estáticos (EST). \*significativo ( $P \leq 0,05$ ) e ns- não significativo.



#### ANEXO IV

**Tabela 4.** Análise da variância dos parâmetros de qualidade espermática avaliados pelo sistema computadorizado *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) após o descongelamento do sêmen de ovinos da raça Santa Inês, criopreservados nas concentrações de 0, 10 ou 20 µM do inibidor U73122.

FV	Quadrado Médio (%)														
	G L	MT	MP	RAP	MED	LEN	EST	VCL	VSL	VAP	LIN	SRT	ALH	BCF	HYP
<b>Inibidor (I)</b>	2	46,59 <sup>ns</sup>	0,20 <sup>ns</sup>	23,95 <sup>ns</sup>	18,14 <sup>ns</sup>	62,07 <sup>ns</sup>	47,96 <sup>ns</sup>	188,79 <sup>ns</sup>	159,11 <sup>ns</sup>	192,31 <sup>ns</sup>	22,76 <sup>ns</sup>	2,31 <sup>ns</sup>	0,27 <sup>ns</sup>	1,09 <sup>ns</sup>	9,78 <sup>ns</sup>
<b>Ovino (O)</b>	3	187,20 <sup>ns</sup>	87,68 <sup>ns</sup>	418,79 <sup>ns</sup>	259,71 <sup>ns</sup>	139,58 <sup>ns</sup>	289,24 <sup>ns</sup>	233,55 <sup>ns</sup>	285,68 <sup>ns</sup>	301,15 <sup>ns</sup>	157,70 <sup>ns</sup>	29,11 <sup>ns</sup>	0,27 <sup>ns</sup>	3,40 <sup>ns</sup>	4,22 <sup>ns</sup>
<b>Interação (I x O)</b>	6	252,82 <sup>ns</sup>	259,99 <sup>ns</sup>	124,54 <sup>ns</sup>	63,61 <sup>ns</sup>	151,11 <sup>ns</sup>	448,24 <sup>ns</sup>	116,07 <sup>ns</sup>	189,77 <sup>ns</sup>	176,78 <sup>ns</sup>	186,81 <sup>ns</sup>	53,90 <sup>ns</sup>	0,95 <sup>ns</sup>	1,04 <sup>ns</sup>	2,38 <sup>ns</sup>
<b>Resíduo</b>	36	254,67	289,81	166,24	111,62	184,71	292,44	238,29	325,05	321,25	197,47	57,84 <sup>ns</sup>	0,12	2,28	10,04
<b>C.V.(%)</b> :		20,78	28,55	30,61	31,84	21,7	31,19	13,5	22,15	19,19	10,49	4,54	7,74	8,41	34,24

Motilidade total (MT), Motilidade progressiva (MP), Espermatozoides com deslocamento rápido (RAP), médio (MED), lentos (LEN) ou estáticos (EST), Velocidade curvilínea (VCL), Velocidade em linha reta (VSL), Velocidade de trajeto (VAP), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), Deslocamento de cabeça (ALH), Batimento/ frequência cruzada (BCF), Hiperatividade (HYP). \*significativo (P≤0,05) e ns- não significativo.

## ANEXO V

**Tabela 5.** Análise da variância dos parâmetros de qualidade espermática avaliados pela associação dos marcadores fluorescentes com iodeto de propídeo, PSA- FITC e JC-1 após o descongelamento do sêmen de ovinos da raça Santa Inês, criopreservados nas concentrações de 0, 10 ou 20 µM do inibidor U73122.

FV	Quadrado Médio (%)								
	GL	PIAIC	PIAIS	PIALC	PIALS	PLAIC	PLAIS	PLALC	PLALS
<b>Inibidor (I)</b>	2	394,62 <sup>ns</sup>	1,63 <sup>ns</sup>	0,83*	16,06*	42,24 <sup>ns</sup>	204,99 <sup>ns</sup>	61,60 <sup>ns</sup>	349,42 <sup>ns</sup>
<b>Ovino (O)</b>	3	346,21 <sup>ns</sup>	10,80 <sup>ns</sup>	0,20 <sup>ns</sup>	2,43 <sup>ns</sup>	35,61 <sup>ns</sup>	1187,59*	62,06 <sup>ns</sup>	2057,61*
<b>Interação (IxO)</b>	6	223,31 <sup>ns</sup>	5,58 <sup>ns</sup>	0,66*	3,71*	104,70*	103,37 <sup>ns</sup>	80,95 <sup>ns</sup>	299,72 <sup>ns</sup>
<b>Resíduo</b>	36	388,7	5,16	0,13	1,25	37,42 <sup>ns</sup>	120,88	63,34	289,89
<b>C.V.(%):</b>		13,5	34,57	20,26	32,83	42,16	13,96	64,22	10,01

Membrana plasmática intacta, Acrossoma intacto e Com função mitocondrial (PIAIC); Membrana plasmática intacta, Acrossoma intacto e Sem função mitocondrial (PIAIS); Membrana plasmática intacta, Acrossoma lesado e Com função mitocondrial (PIALC); Membrana plasmática intacta, Acrossoma lesado e Sem função mitocondrial (PIALS); Membrana plasmática lesada, Acrossoma intacto e Com função mitocondrial (PLAIC); Membrana plasmática Lesada, Acrossoma intacto e Sem função mitocondrial (PLAIS); Membrana plasmática lesada, Acrossoma lesado e Com função mitocondrial (PLALC); Membrana plasmática lesada, Acrossoma lesado e Sem função mitocondrial (PLALS); \*significativo (P≤0,05) e ns- não significativo.

## ANEXO VI

**Tabela 6.** Análise da variância dos parâmetros de qualidade espermática avaliados pela marcador fluorescente de CTC após o descongelamento e após indução da capacitação *in vitro* do sêmen de ovinos da raça Santa Inês, criopreservados nas concentrações de 0, 10 ou 20 µM do inibidor U73122.

FV	Quadrado Médio (%)						
	Antes da indução da capacitação				Após indução da capacitação		
	GL	NC	CP	AR	NC	CP	AR
<b>Inibidor (I)</b>	2	3014,52*	1285,56 <sup>ns</sup>	401,52 <sup>ns</sup>	1545,75*	606,64*	813,02*
<b>Ovino (O)</b>	3	1097,91 <sup>ns</sup>	2076,47 <sup>ns</sup>	285,11 <sup>ns</sup>	2346,68*	1613,68*	1429,05*
<b>Interação (IxO)</b>	6	236,07 <sup>ns</sup>	151,45 <sup>ns</sup>	77,21 <sup>ns</sup>	1374,50*	1460,56*	754,90*
<b>Resíduo</b>	36	838,89	806,22	160,97	14,29	11,65	306,61
<b>C.V.(%):</b>		11,2	32,54	29,36	2,23	2,23	2,74

Número de espermatozoides não capacitados (NC), capacitados (CP) e com acrossoma reagido (AR) \*significativo ( $P \leq 0,05$ ) e ns- não significativo.

## ANEXO VII

**Tabela 7.** Percentual médio ( $\pm$  desvio padrão) da motilidade total de sêmen ovino *in natura* incubado por 4 h em diluente com ou sem glicerol e suplementado com diferentes concentrações de U73122.

<b>Motilidade Total (%)</b>					
<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicerol</b>	<b>Concentrações do U73122 (<math>\mu</math>M)</b>			
		<b>0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>
0	Com	85,37 $\pm$ 7,94 <sup>A a</sup>	84,50 $\pm$ 5,71 <sup>A a</sup>	82,87 $\pm$ 7,26 <sup>A a</sup>	88,75 $\pm$ 4,48 <sup>A a</sup>
	Sem	88,75 $\pm$ 1,50 <sup>A a</sup>	83,25 $\pm$ 6,07 <sup>A a</sup>	75,25 $\pm$ 19,82 <sup>A a</sup>	83 $\pm$ 5,71 <sup>A a</sup>
2	Com	81,75 $\pm$ 5,83 <sup>A a</sup>	79,62 $\pm$ 6,65 <sup>A a</sup>	75,62 $\pm$ 9,27 <sup>A a</sup>	67,12 $\pm$ 15,14 <sup>A a</sup>
	Sem	82,50 $\pm$ 4,79 <sup>A a</sup>	76,50 $\pm$ 8,58 <sup>A a</sup>	78,75 $\pm$ 8,53 <sup>A a</sup>	79,25 $\pm$ 8,13 <sup>A a</sup>
4	Com	68,87 $\pm$ 11,91 <sup>A a</sup>	73,75 $\pm$ 7,71 <sup>A a</sup>	50,12 $\pm$ 35,73 <sup>B b</sup>	48 $\pm$ 75 $\pm$ 34,53 <sup>B b</sup>
	Sem	59,00 $\pm$ 13,24 <sup>A a</sup>	69,00 $\pm$ 25,06 <sup>A a</sup>	66,25 $\pm$ 25,19 <sup>A a</sup>	68,00 $\pm$ 21,35 <sup>A a</sup>

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si, segundo o teste DMS ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 8.** Percentual médio ( $\pm$  desvio padrão) da motilidade progressiva de sêmen ovino *in natura* incubado por 4 h em diluente com ou sem glicerol e suplementado com diferentes concentrações de U73122.

<b>Motilidade Progressiva (%)</b>					
<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicerol</b>	<b>Concentrações do U73122 (<math>\mu</math>M)</b>			
		<b>0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>
0	Com	69,00 $\pm$ 3,93 <sup>A a</sup>	63,75 $\pm$ 4,09 <sup>A a</sup>	63,25 $\pm$ 0,64 <sup>A a</sup>	57,25 $\pm$ 5,63 <sup>A a</sup>
	Sem	76,50 $\pm$ 13,50 <sup>A a</sup>	67,5 $\pm$ 15,84 <sup>A a</sup>	46,25 $\pm$ 10,40 <sup>B b</sup>	46,25 $\pm$ 9,94 <sup>B a</sup>
2	Com	53,12 $\pm$ 5,54 <sup>AB a</sup>	57,62 $\pm$ 4,64 <sup>A a</sup>	44,37 $\pm$ 3,19 <sup>BC a</sup>	40,25 $\pm$ 2,38 <sup>C a</sup>
	Sem	51,75 $\pm$ 11,27 <sup>A a</sup>	47,25 $\pm$ 10,14 <sup>A a</sup>	43,25 $\pm$ 13,02 <sup>A a</sup>	47,5 $\pm$ 2,38 <sup>A a</sup>
4	Com	26,00 $\pm$ 16,62 <sup>AB a</sup>	36,00 $\pm$ 9,65 <sup>A a</sup>	14,87 $\pm$ 10,64 <sup>BC a</sup>	8,75 $\pm$ 6,33 <sup>C b</sup>
	Sem	21,50 $\pm$ 9,94 <sup>B a</sup>	34,50 $\pm$ 20,98 <sup>A a</sup>	26,00 $\pm$ 21,72 <sup>AB a</sup>	24,25 $\pm$ 29,28 <sup>AB a</sup>

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si, segundo o teste DMS ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 9.** Percentual médio ( $\pm$  desvio padrão) de espermatozoides com movimentos rápidos de sêmen ovino *in natura* incubado por 4 h em diluente com ou sem glicerol e suplementado com diferentes concentrações de U73122.

Número de espermatozoides rápidos (%)					
Tempo (h)	Glicerol	Concentrações do U73122 ( $\mu$ M)			
		0	10	20	30
0	Com	57,25 $\pm$ 24,68 <sup>A a</sup>	72,37 $\pm$ 3,49 <sup>A a</sup>	64,75 $\pm$ 10,42 <sup>A a</sup>	67,00 $\pm$ 14,56 <sup>A a</sup>
	Sem	64,00 $\pm$ 18,67 <sup>A a</sup>	71,00 $\pm$ 9,41 <sup>A a</sup>	61,00 $\pm$ 19,66 <sup>A a</sup>	62,25 $\pm$ 19,50 <sup>A a</sup>
2	Com	53,75 $\pm$ 12,19 <sup>AB a</sup>	55,12 $\pm$ 16,39 <sup>AB a</sup>	58,50 $\pm$ 4,70 <sup>A a</sup>	42,00 $\pm$ 8,33 <sup>B a</sup>
	Sem	56,5 $\pm$ 18,41 <sup>A a</sup>	52,0 $\pm$ 7,35 <sup>A a</sup>	53,75 $\pm$ 8,96 <sup>A a</sup>	52,5 $\pm$ 5,2 <sup>A a</sup>
4	Com	28,62 $\pm$ 18,93 <sup>A a</sup>	28,37 $\pm$ 21,17 <sup>A a</sup>	17,37 $\pm$ 14,94 <sup>AB a</sup>	8,87 $\pm$ 6,98 <sup>B b</sup>
	Sem	23,50 $\pm$ 11,12 <sup>A a</sup>	36,00 $\pm$ 21,67 <sup>A a</sup>	27,00 $\pm$ 22,49 <sup>A a</sup>	26,25 $\pm$ 25,96 <sup>A a</sup>

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si, segundo o teste DMS ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 10.** Percentual médio ( $\pm$  desvio padrão) do número espermatozoides de espermatozoides não capacitados, capacitados e com acrossoma reagido, antes e após sêmen ovino criopreservado com concentrações de 0, 10 ou 20  $\mu$ M do U73122, serem submetidos a indução da capacitação *in vitro*.

Parâmetro	Indução da capacitação	Concentração do U73122 ( $\mu$ M)		
		0	10	20
NC	Antes	59,93 ( $\pm$ 15,31) <sup>Ba</sup>	72,96 ( $\pm$ 12,6) <sup>Aa</sup>	70,18 ( $\pm$ 13,73) <sup>Aa</sup>
	Após	38,96 ( $\pm$ 11,14) <sup>Cb</sup>	41,72 ( $\pm$ 6,02) <sup>Bb</sup>	48,53 ( $\pm$ 10,14) <sup>Ab</sup>
C	Antes	27,28 ( $\pm$ 13,73) <sup>Aa</sup>	18,43 ( $\pm$ 14,63) <sup>Ba</sup>	21,59 ( $\pm$ 14,10) <sup>Bb</sup>
	Após	33,37( $\pm$ 5,64) <sup>Ba</sup>	36,34 ( $\pm$ 11,69) <sup>Aa</sup>	30,18 ( $\pm$ 8,06) <sup>Ba</sup>
AR	Antes	12,71 ( $\pm$ 7,76) <sup>Ab</sup>	8,56 ( $\pm$ 4,26) <sup>Bb</sup>	8,21 ( $\pm$ 6,32) <sup>Bb</sup>
	Após	27,65 ( $\pm$ 8,29) <sup>Aa</sup>	23,56 ( $\pm$ 8,87) <sup>Ba</sup>	21, 40 ( $\pm$ 3,06) <sup>Ba</sup>

Espermatozoides não capacitados (NC); espermatozoides capacitados (C); espermatozoides com acrossoma reagido (AR). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si, segundo o teste DMS ( $p \leq 0,05$ ).