

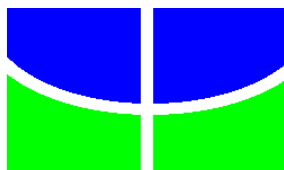
**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DE ESPERMATOZOIDES  
BOVINOS RECUPERADOS DO EPIDÍDIMO**

**ANDRIELLE THAINAR MENDES CUNHA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA  
FEVEREIRO/2015**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DE ESPERMATOZOIDES  
BOVINOS RECUPERADOS DO EPIDÍDIMO**

**Aluno: Andrielle Thainar Mendes Cunha**

**Orientador: Margot Alves Nunes Dode**

**Co-orientador: José de Oliveira Carvalho Neto**

**Dissertação de Mestrado em Ciências Animais**

**PUBLICAÇÃO 129/2014**

**BRASÍLIA  
FEVEREIRO/2015**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CUNHA, A. T. M. **Características estruturais e funcionais de espermatozoides bovinos recuperados do epidídimo**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 55p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta tese de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

CUNHA, A. T. M. **Características estruturais e funcionais de espermatozoides bovinos recuperados do epidídimo**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 55p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília, 2015.  
1. Criopreservação. 2. Istmo. 3. Cinética de espermatozoides. I DODE, M.A.N. II PhD.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DE ESPERMATOZOIDES  
BOVINOS RECUPERADOS DO EPIDÍDIMO**

**ANDRIELLE THAINAR MENDES CUNHA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
ANIMAIS, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**Margot Alves Nunes Dode, Dr., Embrapa Cenargen**

---

**Rodrigo Arruda de Oliveira, Dr., Universidade de Brasília**

---

**Carlos Frederico Martins, Dr., Embrapa Cerrados**

**BRASÍLIA/DF, 12 de FEVEREIRO de 2015**

Aos meus pais **Roberto e Cleia**, ao meu irmão **Brenno** e à minha ‘mãedrastra’ **Suely**, que sempre me apoiaram. Não existem palavras que expressem meu amor, carinho e gratidão.

À minha avó **Terezinha** (*In Memoriam*),

*Tem gente que tem cheiro de cafuné sem pressa.  
Do brinquedo que a gente não largava. Costumo dizer que algumas almas são  
perfumadas, porque acredito que os sentimentos também têm cheiro e tocam  
todas as coisas com os seus dedos de energia. Minha avó era alguém assim.  
Ela perfumou muitas vidas com sua luz e suas cores. A minha, foi uma delas.  
E o perfume era tão gostoso, tão delicado, que ela mudou de frasco, mas ele  
continua vivo no coração de tudo o que ela amou. E tudo o que eu amar vai  
encontrar, de alguma forma, os vestígios desse perfume de Deus, que, numa  
temporada, se vestiu de Terezinha, para me falar de amor.*

*Ana Jácomo*

E àqueles que estiveram ao meu lado durante mais esta conquista.

*Dedico!*

*Sem sonhos, a vida não tem brilho.  
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.  
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.*  
Augusto Cury

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela saúde e pelas oportunidades. Por sempre me iluminar e abençoar, me mostrando diariamente, em pequeninos detalhes, o quanto sou amada e protegida por sua luz divina.

Aos meus **pais**, por serem meu alicerce e sempre acreditarem nos meus sonhos junto a mim. Obrigada por todo o incentivo e compreensão.

Aos meus amigos e familiares que sempre compreenderam meus momentos de ausência.

À minha orientadora **Dra. Margot Alves Nunes Dode**, pela orientação, pelos ensinamentos diários. Por sempre dispor seu tempo e sua paciência, não economizando incentivos e estímulos. Obrigada por todas as oportunidades confiadas a mim e por me mostrar que sempre posso ir além do que imagino.

Ao meu co-orientador **José Carvalho**, por toda a ajuda, pela paciência e presteza em dividir diversos ensinamentos práticos e teóricos desde que cheguei ao Cenargen.

Aos meus amigos de laboratório, **Aline Brito, Allice Ferreira, Ana Luiza, Anelise, Catherine Lara, Felipe Caixeta, José Carvalho, José Sprícigo, Ligiane Leme, Matheus Diógenes, Nayara Kussano, Thiago Braga, Venâncio Augusto e Vladinis Miranda**. Obrigada por toda a ajuda, pela amizade diária e pelos momentos de distração.

À **Ana Luiza**, pela amizade, pelo companheirismo, pelo carinho e preocupação, sempre tão “mãezona”.

À **Nayara Kussano** pela companhia nos momentos difíceis, pela ajuda efetiva com infinitos agregados rastreados, banhos nos agregados, lâminas de agregados... Obrigada por ter sido sempre tão prestativa.

Ao **Mateus Diógenes**, pelo apoio efetivo na primeira etapa do experimento.

Ao Dr. **Carlos Frederico Martins, Carolina Gonzales, Elisa Cunha, George Henrique e Heidi Bessler**, pelo “ponta pé” inicial na iniciação científica. Obrigada pelos ensinamentos, pelas oportunidades e pelo “bê a bá” sobre como sobreviver dentro de um laboratório.

Aos funcionários **Regivaldo Vieira, “Seu Arlindo”, Sydney, “Rambinho,”** sem os quais não seria possível o dia a dia.

À **Ana Cristina Gomes**, pela companhia e conversas que sempre me acalmaram nas salas da microscopia. Obrigada pela amizade e pelo carinho.

Aos pesquisadores **Bianca Damiani, Maurício Machaim, Eduardo Melo, Ricardo Alarmino**, pelo compartilhamento do conhecimento e ensinamentos científicos.

Ao Dr. **Gerson Mourão** por toda a execução estatística e paciência.

Ao Frigorífico Qualimax, por ceder material biológico, indispensável para a execução do experimento.

A todos os professores e mestres, por dividirem seus conhecimentos.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por todo o suporte para que este estudo fosse realizado.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro no projeto.

A Universidade de Brasília, pelo curso oferecido.



## ÍNDICE

Capítulos	Página
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	2
1.2 OBJETIVO	3
1.3 HIPÓTESE	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 ESPERMATOZOIDES	4
2.2 MEMBRANA PLASMÁTICA	5
2.3 EPIDÍDIMO	7
2.4 PLASMA SEMINAL	8
2.5 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA	9
2.6 RESERVATÓRIO ESPERMÁTICO DA TUBA UTERINA	10
2.7 AVALIAÇÕES FÍSICAS E MORFOLÓGICAS DAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS	11
2.8 AVALIAÇÕES FUNCIONAIS	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO 2	19
1 INTRODUÇÃO	20
2 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 REAGENTES	22
2.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	22
2.3 COLETA E CRIOPRESERVAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DO EJACULADO E DO EPIDÍDIMO	23
2.4 COLETA E CRIOPRESERVAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO DE ANIMAIS DE ABATEDOURO	24
2.5 COLETA E PROCESSAMENTO DE PLASMA SEMINAL	24
2.6 AVALIAÇÕES DA MOTILIDADE E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA	25
2.7 AVALIAÇÃO DA CAPACITAÇÃO	25
2.8 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA	26
2.9 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE ACROSSOMAL	27
2.10 COLETA E PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS DA TUBA UTERINA	28
2.11 TESTE DE LIGAÇÃO E AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE ESPERMATOZOIDES LIGADOS ÀS CÉLULAS DA TUBA UTERINA	29
2.12 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	31
2.12.1 EXPERIMENTO 1	31
2.12.2 EXPERIMENTO 2	31
2.12.3 EXPERIMENTO 3	32

2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
3 RESULTADOS	34
3.1 EXPERIMENTO 1	34
3.2 EXPERIMENTO 2	36
3.3 EXPERIMENTO 3	40
4 DISCUSSÃO	42
5 CONCLUSÃO	48
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	53

## RESUMO

### CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS RECUPERADOS DO EPIDÍDIMO

Andrielle Thainar Mendes Cunha<sup>1</sup>, Margot Alves Nunes Dode<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Médica Veterinária, Brasília-DF, Brasil. <sup>2</sup>Pesquisadora Dra., Brasília-DF, Brasil

A utilização de espermatozoides do epidídimo (EP) em técnicas de reprodução assistida tem um papel importante na multiplicação e armazenamento de material genético. Entretanto, melhor conhecimento sobre o comportamento fisiológico destes espermatozoides é necessário para otimizar a sua utilização. Objetivou-se avaliar a viabilidade, resistência e longevidade de EP de sete touros da raça Gir, durante e após a criopreservação, usando os espermatozoides do ejaculado (EJ) como controle. O ejaculado foi coletado através de eletroestimulação, posteriormente os animais foram castrados e os espermatozoides da cauda do epidídimo foram coletados pelo método de extravasamento. Primeiramente, verificou-se a resistência dos EJ e EP diante à criopreservação, as células foram avaliadas logo após a recuperação, após quatro horas de refrigeração e após o descongelamento. Em uma segunda etapa, foi avaliada a longevidade após a criopreservação. Foram utilizados três grupos de espermatozoides do EJ, do EP e um grupo em que EP foram incubados com plasma seminal (EPP). Após o descongelamento amostras dos três grupos foram incubadas por zero, três, seis e 24 horas. Em cada momento foi avaliada a motilidade total e progressiva, integridade de membrana plasmática, integridade acrossomal, morfologia espermática capacitação. Finalmente foi avaliada a capacidade dos espermatozoides do epidídimo de se ligarem às células da tuba uterina (CTU). Para isso foram utilizados os grupos EJ, EP e EPP, foram co-incubados, com CTU por zero, três, seis e 24 horas. Devido ao resultado obtido, um segundo teste foi realizado utilizando testículos de quatro touros, coletados em abatedouro. Um testículo de cada animal foi utilizado para o grupo de EP criopreservado (EP-C) e o outro para o grupo de EP fresco (EP-F). Os dados foram analisados usando procedimento GLIMMIX do programa SAS ( $P \leq 0,05$ ). Os EP apresentaram características de qualidade semelhantes aos do EJ frescos e após a criopreservação ( $P > 0,05$ ). Entretanto, foram mais resistentes à refrigeração do que os do EJ, apresentando maior MT ( $79,8 \pm 4,5$  e  $56,8 \pm 5,6$ ), maior MP ( $46,1 \pm 3,5$  e  $29,2 \pm 3,2$ ) e maior porcentagem de acrossoma íntegro ( $68,7 \pm 5,8$  e  $48,5 \pm 6,1$ ). Após o descongelamento, e 6h de incubação os grupos EP e EPP comparados com o EJ apresentaram maior porcentagem de membrana plasmática íntegra ( $29 \pm 4,3$ ,  $28,2 \pm 4,2$  e

16,4±3,4), maior porcentagem de espermatozoides com acrossoma intacto (31,6±3,8, 31,6±3,8 e 19,9±3,2) e maior porcentagem de espermatozoides não capacitados (81±3,5, 80,9±3,5 e 70,3±3,7). O número de espermatozoides ligados após a co-incubação das CTU com EJ, EP ou EPP não diferiu ( $P>0,05$ ) em nenhum grupo, a análise dentro de cada grupo mostrou que ambos apresentaram queda gradativa no número de espermatozoides ligados às CTU, sendo que o menor número foi observado às 24 h para todos os grupos. No segundo teste de ligação, o grupo EP-F apresentou maior número de células ligadas aos 30 min (130,9±21,2) e às 24 horas (131,7±21,2) de incubação do que o grupo EP-C aos 30 min (88±21,2) e 24 h (20,4±21,2). Pode-se concluir que EP são mais resistentes à refrigeração dos que os do EJ, apresentam maior longevidade e características de capacitação tardia, quando comparados ao EJ. Além disso, os EP se ligam às CTU da mesma forma que os EJ, no entanto a criopreservação pode afetar esta ligação.

Palavras-chave: criopreservação, istmo, cinética de espermatozoides.

## ABSTRACT

### STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF BOVINE SPERM RECOVERED FROM EPIDIDYMISS

Andrielle Thainar Mendes Cunha<sup>1</sup>, Margot Alves Nunes Dode<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Veterinary, Brasília-DF, Brazil, <sup>2</sup>Researcher, Dr., Brasília-DF, Brazil

The use of epididymal sperm (ES) in assisted reproductive technologies is an important tool for multiplication and conservation of genetic material. However, a better understanding of several aspects of sperm physiology is needed to optimize its use. The aim of this study was to evaluate the strength, the post thawed viability, longevity and sperm characteristics behavior of ES from 7 Gir bulls, during and after cryopreservation, using ejaculated sperm (EJ) as a control. After ejaculated sperm was collected the testis were removed and sperm from the cauda epididymis were recovered. First we evaluate the resistance of ES and EJ to cryopreservation, sperm were evaluated just after recovering, after 4 h of cooling and after freezing. Then, we evaluate the post thawing longevity by examining the sperm after different periods of incubation. Three groups were used ES, EJ, and a third group, in which ES was incubated with seminal plasma for 10 min after thawed (ESS). After thawing, samples from the 3 groups were incubated for 0, 3, 6 e 24 h. In each moment they were evaluated for total motility and progressive motility, plasma membrane integrity, acrosome integrity, morphology and capacitation. Finally, we evaluated the ability of ES, EJ and ESS to bind to oviduct epithelium cells (OEC), Samples from EJ, EP e EPP groups were co-incubated with OEC for 0, 3, 6 e 24 h. Due to the results obtained, another test had to be done to evaluate if the cryopreservation process was affecting ES binding. To do that we used testis from 4 bulls collected at slaughter house. From each animal one testis was used for the fresh sperm (ES-F) and the other for the frozen sperm (EP-C). Data analysis was performed using GLIMMIX from SAS ( $P \leq 0.05$ ). Fresh and cryopreserved ES presented all quality parameters similar ( $P > 0.05$ ) to the EJ. However, after cooling at 4°C, ES showed to be more resistance to cold than the EJ presenting greater TM ( $79.8 \pm 4.5$  and  $56.8 \pm 5.6$ ), greater PM ( $46.1 \pm 3.5$  and  $29.2 \pm 3.2$ ) and higher percentage of cells with intact acrosome ( $68.7 \pm 5.8$  and  $48.5 \pm 6.1$ ) than EJ. After thawed at 6 h of incubation ES and ESS compared to EJ had a higher percentage of intact membranes ( $29 \pm 4.3$ ,  $28.2 \pm 4.2$  and  $16.4 \pm 3.4$ ), higher percentage of cells with intact acrosome ( $31.6 \pm 3.8$ ,  $31.6 \pm 3.8$  and  $19.9 \pm 3.2$ ) and higher percentage of non-capacitated sperm

( $81 \pm 3.5$ ,  $80.9 \pm 3.5$  and  $70.3 \pm 3.7$ ). The number of bounded sperm after co-incubation with OEC was similar ( $P > 0.05$ ) for EJ, ES and ESS groups. The analysis within the group showed that all had a decreased on the number of bounded sperm, with the lowest number of bounded sperm found at 24 h of incubation. In the second biding test the group EF had a higher number of bounded sperm at 30 min ( $130.9 \pm 21.2$ ) and at 24 h ( $131.7 \pm 21.2$ ) of incubation than the EC (30 min= $88 \pm 21.2$  and 24 h= $20.4 \pm 21.2$ ). It can be concluded that ES are more resistant to cooling than the EJ, presenting a greater longevity and a delay on capacitation process than the EJ. In addition, ES binds to OEC similarly to EJ; however cryopreservation can affect that binding.

Keywords: cryopreservation, isthmus, sperm kinetics.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	Testículo sendo retirado da bolsa escrotal (A); Testículo limpo, sem a túnica vaginal (B); coleta dos espermatozoides da cauda do epidídimo através do método de extravasamento (C).	24
Figura 2	Espermatozoide corado com hidróclorido de clotertraciclina (CTC) apresentando ausência ou baixa fluorescência na região pós acrossomal e fluorescência brilhante na região acrossomal (padrão de célula capacitada), observado em microscópio de epifluorescência em aumento de 100x.	26
Figura 3	Espermatozoide corado com diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídeo (IP), apresentando membrana plasmática íntegra (A), membrana plasmática lesada (B) e membrana plasmática semi-lesada (C), observado em microscópio de epifluorescência em aumento de 40x.	27
Figura 4	Fotografia em microscopia de contraste de fase (1) e epifluorescência (2) do mesmo campo de leitura. Espermatozoide vivo com acrossoma íntegro (A) visualizado em contraste de fase (1) não se apresenta corado com a conjugação de isotiocionato de fluoresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim ( <i>peanut agglutinin</i> – PNA) e iodeto de propídeo (IP) quando avaliado em epifluorescência (2). Espermatozoide morto com acrossoma reagido (B) visualizado no contraste de fase (1) apresenta-se corado com IP-PNA em epifluorescência (2) em aumento de 40x.	28
Figura 5	Fotografia da dissecação da tuba uterina de bovinos (A) momento em que as células da luz do istmo são retiradas utilizando o bordo de uma lâmina de vidro induzindo a saída das células por uma de suas extremidades (B).	29
Figura 6	Fotografia de contraste de fase em aumento de 40x do complexo agregado células da tuba uterina-espermatozoides após 30 minutos de co-incubação com espermatozoides recuperados do epidídimo (A) e após a contagem dos espermatozoides (marcados com um x em azul) e medição do perímetro de agregado (linha em vermelho) para avaliação do número de espermatozoides ligados por mm de agregado (B).	30
Figura 7	Porcentagem total de espermatozoides móveis (A) e com motilidade progressiva (B) do ejaculado (EJ), epidídimo (EP), epidídimo + plasma seminal (EPP) e média marginal (MM)	37

após o descongelamento nos períodos de 0 h, 3 h, 6 h e 24 h de incubação.. Média obtida a partir de uma réplica por touro (n=7). <sup>A,B</sup>Diferença significativa entre grupos a cada momento de incubação ( $P \leq 0,05$ ). <sup>a,b</sup> Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo ( $P \leq 0,05$ ).

- Figura 8 Porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais do ejaculado (EJ), epidídimo (EP), do epidídimo + plasma seminal (EPP) e média marginal (MM) após o descongelamento e incubação nos períodos de 0 h, 3 h, 6 h e 24 h de incubação. Média obtida a partir de uma réplica por touro (n=7). <sup>A,B</sup>Diferença significativa entre grupos a cada momento de incubação ( $P \leq 0,05$ ). <sup>a,b</sup> Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo ( $P \leq 0,05$ ). 38
- Figura 9 Porcentagem de membrana íntegra de espermatozoides do ejaculado (EJ), epidídimo (EP) e do epidídimo + plasma seminal (EPP) após o descongelamento e incubação nos períodos de 0 h, 3 h, 6 h e 24 h de incubação. Média obtida a partir de uma réplica por touro (n=7). <sup>A,B</sup>Diferença significativa entre grupos a cada momento de incubação ( $P \leq 0,05$ ). <sup>a,b</sup> Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo ( $P \leq 0,05$ ). 39
- Figura 10 Porcentagem de espermatozoides vivos sem reação no acrossoma do ejaculado (EJ), epidídimo (EP) e do epidídimo + plasma seminal (EPP). Após o descongelamento e incubação nos períodos de 0 h, 3 h, 6 h e 24 h de incubação. Média obtida a partir de uma réplica por touro (n=7). <sup>A,B</sup>Diferença significativa entre grupos a cada momento de incubação ( $P \leq 0,05$ ). <sup>a,b</sup> Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo ( $P \leq 0,05$ ). 39
- Figura 11 Porcentagem de espermatozoides não capacitados do ejaculado (EJ), epidídimo (EP) e do epidídimo + plasma seminal (EPP). Após o descongelamento e incubação nos períodos de 0 h, 3 h, min 6 h e 24 h de incubação. Média obtida a partir de uma réplica por touro (n=7). <sup>A,B</sup>Diferença significativa entre grupos a cada momento de incubação ( $P \leq 0,05$ ). <sup>a,b</sup> Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo ( $P \leq 0,05$ ). 40



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.	Porcentagem (médias±EP) de espermatozoides móveis, com motilidade progressiva, membrana plasmática íntegra, vivos com acrossomal íntegro, morfologicamente normais de espermatozoides do ejaculado (EJ) e do epidídimo (EP) imediatamente após a coleta (fresco), após refrigeração a 5°C por 4 h e após a criopreservação.	35
Tabela 2.	Número de espermatozoides ligados por mm de agregados de células da tuba uterina após co-incubação por 30 minutos, seis horas e 24 horas.	41
Tabela 3.	Porcentagem (médias±EP) de espermatozoides ligados por mm de agregados de células do oviduto após co-incubação por 30 minutos, seis horas e 24 horas.	42

## **CAPÍTULO 1**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de espermatozoides do epidídimo tem sido objeto de estudo principalmente de grupos de pesquisa envolvidos com a preservação de espécies. Isso porque essas células podem ser usadas como uma ferramenta genética valiosa para manter a variabilidade em populações mantidas em cativeiro e para preservar espermatozoides viáveis de animais exóticos ou em extinção.

Entretanto, nos últimos anos com o desenvolvimento e o uso em grande escala de biotécnicas da reprodução assistida, a recuperação de espermatozoides do epidídimo para a formação de bancos de germoplasma ou para a obtenção de produtos de animais geneticamente importantes, tornou-se viável em quase todas as espécies de mamíferos.

Traumatismos, enfermidades ou mesmo a morte podem terminar prematuramente a vida produtiva de animais de importância econômica e, em tais circunstâncias os espermatozoides do epidídimo podem ser a única fonte de gametas de machos elite para serem utilizados em programas de reprodução assistida (MARTINS et al., 2007). Entretanto, espermatozoides do ejaculado e epidídimo diferem em várias características tais como metabolismo, composição da membrana plasmática, sítios de ligação, características de motilidade, capacidade de sofrer a capacitação e resistência ao frio (MILLER et al., 1990; HAMMERSTEDT et al., 1990; GOOVAERTS et al., 2006; STOUT, 2012). Desta forma, para maximizar o uso de espermatozoides epididimários em técnicas de reprodução assistida as diferenças existentes entre eles e os do ejaculado devem ser levadas em consideração para que se possa obter melhores resultados e uso eficiente desse germoplasma.

Vários trabalhos já reportaram a produção de embriões e produtos nascidos, utilizando espermatozoides do epidídimo, em várias espécies (FRASER & DRURY 1976; MARTINS et

al., 2007; MATÁS et al., 2010; KRISHNAKUMAR et al., 2011). No entanto, o tratamento dado a essas células é baseado na fisiologia dos espermatozoides do ejaculado, o que pode ser a principal razão de tantas divergências nos resultados obtidos quando esses espermatozoides são utilizados em técnicas de reprodução. Além disso, informações comparando as características funcionais dos espermatozoides do ejaculado com o do epidídimo do mesmo animal, são praticamente inexistentes, o que devido à grande variação existente entre indivíduos pode trazer resultados equivocados.

Este estudo visou comparar espermatozoides do ejaculado e do epidídimo coletados do mesmo animal na tentativa de melhor compreender as diferenças fisiológicas entre esses espermatozoides, caracterizando aspectos funcionais e estruturais tais como longevidade, resposta à refrigeração, criopreservação e a capacidade de se ligar as células do oviduto. Essas informações podem ser utilizado para que se possa ajustar os protocolos para o uso em biotécnicas como a inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e produção *in vitro* de embriões (PIVE), garantindo melhor resultado de forma mais eficiente.

## **1.2 OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar características espermáticas como a resistência, longevidade e viabilidade de espermatozoides do epidídimo de bovinos, durante e após o descongelamento.

## **1.3 HIPÓTESE**

Espermatozoides do epidídimo são mais resistentes à criopreservação apresentando melhor qualidade e longevidade pós-descongelamento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Espermatozoides

Os espermatozoides são formados a partir de células germinativas primordiais, nos túbulos seminíferos dos testículos, por um processo denominado espermatogênese. Tal processo pode ser dividido em espermatocitogênese e espermiogênese, e envolvem uma série de divisões e modificações das células germinativas primordiais, dando origem aos espermatozoides (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Ao final da espermatogênese, ocorre a liberação dos espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos, em um processo chamado de espermição.

Os espermatozoides são células haplóides, alongadas e constituídas de dois componentes principais: cabeça e cauda, unidas pela região do colo (FLESCH & GADELLA 2000). Três membranas estão presentes no gameta masculino: a membrana nuclear, membrana acrossomal (interna externa) e membrana plasmática (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A cabeça e dimensões dos espermatozoides podem variar de acordo com a espécie. Nos bovinos, estudos feitos por Carvalho (2013) indicaram dimensões de 0,29  $\mu\text{m}$  de altura, perímetro de 28,4  $\mu\text{m}$  e uma área de superfície de 46,9  $\mu\text{m}^2$ . A cabeça do espermatozoide possui formato arredondado e achatado, sendo a maior parte constituída pelo núcleo. Na parte frontal da cabeça do espermatozoide, está localizado o acrossoma, formado por duas membranas contendo glicoproteínas e açúcares. Em seu interior também estão localizadas enzimas, tais como hialuronidase e acrosina, as quais são liberadas após a ligação dos espermatozoides com a zona pelúcida do ovócito, em um processo denominado reação

acrossomal. Durante a reação acrossomal, a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática se fundem, formando poros, liberando conteúdo acrossômico. Desta forma o acrossoma pode ser considerado uma vesícula secretora modificada, oriunda do complexo de Golgi (FLESCH & GADELLA 2000; GILBERT 2003). Essas enzimas auxiliam no processo de fecundação, participando da digestão da zona pelúcida e permitindo a entrada do material genético do espermatozoide no ovócito (BARTH & OKO, 1989; GILBERT, 2003; KNOBIL & NEILL, 2006). Portanto, um acrossoma íntegro é essencial para a fecundação (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Na região pós-acrossomal encontra-se a parte posterior do núcleo e microtúbulos onde é formada a fossa de implantação ou colo em que a cauda é inserida (BARTH & OKO, 1989).

A cauda do espermatozoide é composta de colo ou pescoço e peças intermediária, principal e terminal. O colo conecta a cabeça do espermatozoide com a cauda (HAFEZ & HAFEZ, 2004), a qual fornece ao espermatozoide a capacidade de se movimentar (KNOBIL & NEILL, 2006). A cauda é formada pelo axonema central, uma estrutura composta por nove pares de microtúbulos dispostos radialmente ao redor de dois microtúbulos centrais (MORTIMER, 2000). Entretanto, à medida que vão se tornando mais distais, os túbulos duplos vão se dissociando e desaparecendo, sendo que o último a desaparecer é o túbulo central (BARTH & OKO, 1989). Na peça intermediária, o axonema é circundado por um conjunto de mitocôndrias dispostas em espiral. A principal função destas mitocôndrias é disponibilizar energia para o batimento flagelar através da produção de ATP.

## **2.2 Membrana plasmática**

A membrana plasmática exerce um papel fundamental na sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo feminino e na manutenção de sua capacidade fecundante. Possui grande especificidade, atuando como uma barreira seletiva entre componentes presentes no meio intra e extracelular, sendo que algum evento que modifique sua estrutura pode comprometer a sua função. É formada por uma estrutura assimétrica, composta por uma bicamada lipídica, com faces interna e externa, as quais estão associadas proteínas, glicoproteínas, colesterol e glicolipídios. Estes diferentes componentes formam um grande mosaico fluido, altamente organizado onde cada região é recoberta por sítios de ligação com

afinidades específicas (GWATHMEY et al., 2006). Desta forma, cada região da membrana plasmática pode ser considerada como tendo domínios e funções específicas. A região que recobre a cabeça do espermatozoide tem como função interagir com o ovócito; enquanto a região que recobre a peça intermediária, onde estão localizadas as mitocôndrias estão envolvidas na produção de energia e a região que recobre o flagelo, envolvido na motilidade (FLESCH & GADELLA, 2000). As proteínas presentes nos diferentes domínios da membrana plasmática realizam o transporte específico de moléculas, sendo que este transporte pode ser influenciado pela fluidez e permeabilidade da membrana. Esta fluidez está diretamente relacionada com os lipídios que compõem a membrana plasmática (ALBERTS et al., 1994), quantidade de colesterol, níveis de saturação de ácidos graxos e fosfolipídios presentes na membrana (WOLFE et al., 1998), assim como pela temperatura a qual esta é exposta (ALBERTS et al., 1994; FLESH & GADELLA, 2000; CELEGHINI, 2005;) As moléculas lipídicas que compõem a membrana são anfipáticas, compostas por uma superfície hidrofílica (polar) voltada para o meio externo e outra superfície hidrofóbica (apolar), voltada para o meio interno. Os lipídios de maior abundância são os fosfolipídios: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomielina. Diferenças nos tamanhos e disposição dos lipídios na formação da membrana plasmática são muito importantes, uma vez que influenciam na habilidade das moléculas de se agrupar, afetando a fluidez da membrana (ALBERTS et al., 1994). A membrana plasmática não é uma estrutura estática, seus componentes se dispõem de forma aleatória e são livres para se movimentarem. Tal movimentação caracteriza a fluidez da membrana, estando esta a temperatura ambiente, onde a membrana se encontra em uma fase também conhecida como estado líquido-cristalino. A proporção de colesterol:lipídeos, os tipos de lipídios, bem como a temperatura são fatores que determinam a fluidez da membrana (AMANN & GRAHAM, 1992). De uma maneira geral, quanto mais colesterol, menos flexível, fluída e permeável será a membrana (AMANN & GRAHAM, 1992; ALBERTS, 1994; GIRAUD, 2000).

### 2.3 Epidídimo

O Epidídimo está localizado entre os ductos aferentes e deferentes sendo composto por um ducto enovelado, pelo qual passam os espermatozoides, em um trajeto que demora aproximadamente nove a 13 dias (DACHEUX, 2014). Durante o seu transporte, os espermatozoides passam por mudanças anatômicas, fisiológicas e moleculares adquirindo características que auxiliam em sua fertilidade, tais como a migração da gota citoplasmática, aquisição de motilidade e alterações nucleares (COOPER, 2007). Anatomicamente, o epidídimo pode ser dividido em cabeça, corpo e cauda, sendo que cada região exerce um papel importante na maturação da célula espermática.

A cabeça do epidídimo é formada por epitélio pseudoestratificado, com lúmen estreito, cílios altos e baixa quantidade de espermatozoides, e está relacionada com a reabsorção da maioria dos fluidos provenientes dos túbulos seminíferos. O corpo do epidídimo é composto por um epitélio pseudoestratificado, com cílios encurvados e alguns vacúolos apresentando maior lúmen e maior concentração de espermatozoides. Nessa região ocorre a maturação dos espermatozoides, caracterizada pela fase final da condensação da cromatina nuclear, onde os espermatozoides adquirem movimentos vibratórios e passam a apresentar capacidade fecundante (SELIGMANN et al., 1992; SCHIMMING et al., 2012). O ambiente da cauda do epidídimo possui epitélio pseudoestratificado, com poucos cílios e um lúmen amplo, e maior concentração de espermatozoides. É nessa porção em que ocorre o armazenamento e manutenção de espermatozoides maduros até o momento da ejaculação (BARTH & OKO, 1989; HAFEZ & HAFEZ, 2004; KNOBIL & NEIL, 2006;).

Entre os principais constituintes que compõem o ambiente epididimário, estão diversas proteínas, tais como osteopontina, manosidase e galactosidase, lactoferrina e clusterrina (MOURA et al. 2006). Estes fatores associados a um ambiente diferenciado do epidídimo garantem a manutenção da viabilidade espermática, conservando sua capacidade de fecundação por várias semanas (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Além disto, acredita-se que a manutenção da viabilidade espermática na cauda do epidídimo também esteja associada a fatores hormonais, juntamente a um ambiente hiperosmótico com baixo teor de cálcio (HARRISON et al., 1992; DACHEUX et al., 2003). Na espécie bovina, a cauda do epidídimo é capaz de armazenar uma concentração de espermatozoides para até dez ejaculados sucessivos. (BEDFORD, 1994).



## 2.4 Plasma seminal

As glândulas acessórias ou glândulas sexuais, compostas por próstata, vesículas seminais, bulbo uretral e ampola do ducto deferente, são responsáveis por produzir as secreções do ejaculado, conhecidas como plasma seminal. No momento da ejaculação, o plasma seminal entra em contato com os espermatozoides, proporcionando um ambiente nutritivo e protetor para os espermatozoides ao entrar em contato com o trato reprodutivo da fêmea. Embora a completa composição do plasma seminal ainda esteja sendo estudada, sabe-se que este é composto por vários componentes, incluindo ácido cítrico, frutose e outros açúcares, glicoproteínas e proteínas (JUYENA & STELLETTA, 2012). Dentre estes componentes, as proteínas exercem importante função nos espermatozoides, pois conferem maior estabilidade à membrana plasmática, além de participarem na formação dos reservatórios espermáticos e ligação dos espermatozoides à zona pelúcida do ovócito.

Rego et al., (2014) estudando o plasma seminal de 56 touros *Bos indicus* identificaram 46 tipos diferentes de proteínas. Do total de proteínas encontradas, as mais abundantes foram da família das *Binder Sperm Proteins* (BSP), seguida pelas espermedesinas-1 e espermedesinas-Z13. As BSP's correspondem por mais de 70% das proteínas totais do plasma seminal (IGNOTZ et al., 2007), sendo três BSP's identificadas como principais: BSP-A1 e BSP-A3 também conhecidas como PDC-109 (IGNOTZ et al., 2001), BSP-A3, e BSP- 30 kD também conhecida como BSP-A5 (MOURA et al., 2006). As BSP's, também conhecidas como proteínas ligadoras de heparina, estimulam o efluxo de colesterol, alterando a permeabilidade da membrana plasmática, mecanismos esses associados com a capacitação (THÉRIEN et al., 1998) e estão diretamente envolvidas na interação com a heparina presente no trato reprodutivo da fêmea, sendo cálcio-dependentes (DESNOYERS & MANJUNATH, 1992). Além disto, estão envolvidas na ligação dos espermatozoides ao epitélio da tuba uterina, formando o reservatório de espermatozoides na mesma (SOUZA et al., 2008).

Devido à relação destas proteínas com mecanismos necessários à fecundação, alguns estudos vêm sendo realizados em diferentes espécies, com o intuito de avaliar a influência da adição de plasma seminal à espermatozoides do ejaculado e do epidídimo (GRAHAM 1994; PURDY & GRAHAM, 2004; HEISE et al., 2010; ROVEGNO et al., 2013).

Graham (1994) congelou espermatozoides do ejaculado e do epidídimo, de touros e carneiros, com ou sem plasma seminal. Neste estudo, foi identificado que espermatozoides do

epidídimo responderam positivamente à presença do plasma seminal, apresentando maior motilidade após a criopreservação. Além disto, foi demonstrado que a adição de plasma seminal em espermatozoide equino fresco ou congelado melhorou o resultado de prenhes das éguas (HEISE et al., 2010). Outro efeito positivo da adição do plasma seminal foi relacionado à velocidade de ligação dos espermatozoides à zona pelúcida do ovócito. Harkema et al. (2004) demonstraram que espermatozoides do epidídimo de javali, incubados com plasma seminal, se ligam mais rapidamente à zona pelúcida quando comparado à espermatozoides do epidídimo sem adição de plasma seminal. Segundo os autores, o plasma seminal aumenta os sítios de ligação das proteínas do espermatozoide à zona pelúcida

## **2.5 Capacitação espermática**

O processo de capacitação é definido por mudanças fisiológicas que o espermatozoide deve sofrer no trato reprodutivo da fêmea, para tornar-se capaz de fecundar um ovócito (BARTH & OKO, 1989). Esse processo consiste na remoção ou alterações de substâncias que estabilizam a membrana plasmática do espermatozoide. Dentre os processos envolvidos, destacam-se modificações na estabilidade e fluidez da membrana, perda de colesterol e rearranjo de proteínas que compõe a membrana, além da aquisição de hiperatividade na motilidade do espermatozoide (FLESCH & GADELLA, 2000).

Dentre os componentes relacionados ao processo de capacitação, estão a albumina, bicarbonato de sódio, e o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (HARRISON et al., 1992). O aumento nos níveis de bicarbonato é um dos primeiros responsáveis pela desestabilização de membrana, agindo diretamente na redistribuição do colesterol pela membrana plasmática (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007), facilitando a sua extração pela albumina. O  $\text{Ca}^{2+}$ , por sua vez, está envolvido na fusão da membrana plasmática do espermatozoide com a zona pelúcida do ovócito, abrindo os canais de sódio e aumentando o PH intracelular (FLESCH & GADELLA, 2000).

## 2.6 Reservatório espermático da tuba uterina

Após a ejaculação, os espermatozoides entram em contato com o trato reprodutivo da fêmea e seguem em direção à tuba uterina. A tuba uterina é uma estrutura formada por uma camada muscular, revestida internamente por um epitélio que contém principalmente dois tipos de células: células ciliadas e secretoras (KNOBIL & NEILL, 2006). Na tuba uterina acontecem importantes eventos relacionados à reprodução, tais como a formação dos reservatórios espermáticos, fecundação, clivagem e ativação do genoma embrionário (HUNTER & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2004). A formação dos reservatórios ocorre na região do istmo em várias espécies de mamíferos, sendo que o início da colonização ocorre aproximadamente 30 min. após a cópula (GILBERT, 2003). Este reservatório é de grande importância, pois garante a disponibilidade de espermatozoides viáveis, aptos a fecundar um ovócito até o momento da ovulação (GUALTIERI et al., 2010).

A ligação dos espermatozoides às células da tuba uterina está relacionada com a presença de proteínas e açúcares que compõem a membrana plasmática do espermatozoide e células da tuba uterina (FAZELI et al., 1999; IGNOTZ et al., 2001). Em suínos e bovinos, duas grandes famílias de proteínas presentes no plasma seminal, as espermedesinas e BSP, funcionam como receptores ligantes a açúcares presentes nas células da tuba uterina, como a fucose e manose. Esses açúcares por sua vez estão ligados a receptores presentes nas células tubáricas, sendo as anexinas o principal receptor caracterizado até o momento. Após a formação dos reservatórios na tuba uterina, os espermatozoides permanecem ligados até a ovulação, momento este em que os espermatozoides se desprendem gradativamente e seguem para a região da ampola. Entretanto, os fatores exatos que fazem com que os espermatozoides se desliguem do epitélio do reservatório, ainda são desconhecidos (GUALTIERI et al., 2010).

## 2.7 Avaliações físicas e morfológicas das características espermáticas

A avaliação das amostras seminais representa um componente indispensável para o sucesso dos programas de reprodução animal (ARRUDA et al., 2011). O maior entendimento da qualidade espermática em amostras seminais é fundamental para que as avaliações *in vitro* do espermatozoide, possam projetar de forma segura expectativas de fertilidade com sua aplicação em testes a campo (ARRUDA et al., 2004; MAZIERO et al., 2009).

Embora nenhuma técnica de avaliação realizada isoladamente apresente sensibilidade suficiente para a determinação da fertilidade, a combinação de diversos métodos tem agregado maior precisão para a estimativa do potencial de fecundação das amostras de sêmen congelado. Desta forma, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver técnicas de avaliação *in vitro* dos espermatozoides, que avaliem com exatidão a habilidade fecundante de uma amostra de sêmen. A análise de rotina do sêmen consiste da análise subjetiva da motilidade, concentração e morfologia (CRESPILHO & PAPA, 2010). O método mais utilizado para avaliação da motilidade é a sua determinação de forma subjetiva através de microscopia ótica. Este método é uma forma indireta de avaliação, sendo simples e de baixo custo, podendo apresentar grande variabilidade (MATOS et al., 2009). Entretanto, se feita por um técnico treinado, a avaliação subjetiva, deve apresentar resultados semelhantes aos obtidos pela avaliação objetiva (CARVALHO et al., 2009; ARRUDA et al., 2011) realizada por um sistema automatizado. Dentre os diversos tipos de métodos de avaliação computadorizada, o *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) vem sendo amplamente utilizado. Este método de avaliação determina não somente a porcentagem de células móveis, mas também quantifica características específicas do movimento espermático, tais como: velocidade curvilínea, velocidade linear progressiva, batimento flagelar, velocidade média da trajetória, amplitude de deslocamento lateral da cabeça e frequência de batimento flagelar (MATOS et al., 2009). Este método baseia-se na obtenção de imagens precisas e consecutivas dos espermatozoides em movimento, as quais são processadas e analisadas por um software. A avaliação objetiva fornece informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula, bem como de subpopulações de células espermáticas (MORTIMER, 2000).

Além da motilidade, o exame morfológico da célula espermática tem sido utilizado de forma rotineira para seleção e controle de qualidade do sêmen. Para esta avaliação poderão ser

utilizados esfregaços corados ou preparação úmida em microscópio de contraste de fase ou de interferência diferencial, associados ou não. O método de preparação úmida é mais indicado que esfregaços corados por técnicas convencionais (CBRA, 2013). O sistema de avaliação da morfologia espermática pode ser variado, sendo que atualmente o padrão mais utilizado divide as patologias espermáticas em defeitos maiores e menores (CBRA, 2013).

Outro componente de grande importância no espermatozoide e que reflete a viabilidade celular, é a avaliação da integridade da membrana plasmática. Esta é geralmente avaliada após a coloração dos espermatozoides com corantes permeáveis ou não à membrana, possibilitando a identificação de espermatozoides com membrana íntegra ou lesada (CBRA, 2013). Estes corantes podem ser avaliados em microscopia de luz, tais como eosina/nigrosina e, *trypan blue* ou em microscópio de fluorescência, utilizando sondas fluorescentes, tais como diacetato de 6-carboxifluoresceína (C-FDA) e SYBR *green*. As sondas fluorescentes são atualmente mais recomendadas, podendo ser avaliadas por citometria de fluxo ou microscopia de epifluorescência. Dentre as possibilidades de corantes o C-FDA vem sendo amplamente utilizado. Este corante é permeável a membrana plasmática, e quando hidrolisado por esterases no interior da célula, altera sua estrutura, produzindo o diacetato de 6-carboxifluoresceína livre. Este é retido dentro da célula que possui a membrana intacta, a qual exibirá fluorescência verde (CELEGHINI, 2005), sendo estas consideradas vivas (SILVA & GADELLA, 2006). Além do uso individual, podem ser feita a associação de diferentes sondas fluorescentes, com o intuito de marcar tanto as células com membrana íntegra como lesada. Entre os corantes para marcação de células com membrana lesada, o Iodeto de Propídio (IP) tem sido o mais utilizado. Este corante é de fácil preparação, estável e apresenta boa eficiência na avaliação. O IP possui afinidade por DNA, marcando de vermelho o núcleo do espermatozoide com uma lesão de descontinuidade na membrana plasmática (CELEGHINI, 2005; PRADO, 2009).

Outra avaliação importante a ser realizada é a avaliação da integridade acrossomal (PRADO, 2009), pois o acrossoma deve estar intacto antes e durante o trajeto do espermatozoide até a sua ligação com a zona pelúcida do ovócito. Portanto, uma reação acrossomal precoce pode diminuir a fertilidade de uma amostra de sêmen (SILVA & GADELLA, 2006; PRADO, 2009). Para avaliação da condição acrossomal, assim como para integridade de membrana plasmática, variados tipos de corantes e técnicas podem ser utilizadas. Entre as possibilidades, as sondas fluorescentes conjugadas às lecitinas são

amplamente utilizadas, tais como o *Pisum sativum* (PSA) ou o *Arachis hypogaea* (PNA) associados ao isotiocionato de fluoresceína (FITC), (FARLIN et al., 1992; SILVA & GADELLA, 2006). Durante a reação do acrossoma, ocorre a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa, com a formação de poros que permite a entrada da lecitina PNA no interior do acrossoma. Esta lecitina então liga-se a uma glicoproteína presente na face interna da membrana acrossomal, marcando este acrossoma como reagido (FARLIN et al., 1992).

Outra análise relacionada a modificações na membrana é a avaliação da capacitação espermática. Durante a capacitação ocorrem alterações no colesterol presente na membrana, mudando sua permeabilidade com aumento do influxo de íons  $\text{Ca}^+$ . Baseado nisto, o uso de hidróclorido de clortetraciclina (CTC) tem sido proposto como um método de avaliação da capacitação, uma vez que o CTC é uma sonda fluorescente quelante do  $\text{Ca}^+$ , sendo capaz de identificar a presença ou ausência, como também a localização do cálcio na membrana (SALING & STOREY, 1979). Desta forma, esse corante pode identificar espermatozoides capacitados ou não, devido às modificações do fluxo e efluxo de cálcio durante o processo de capacitação.

### 2.7.1 Avaliações funcionais

Além dos testes de motilidade ou avaliação da estrutura e morfologia espermática, outros testes têm sido realizados com a finalidade de avaliar a interação dos espermatozoides com o trato reprodutivo da fêmea ou ovócito. Entretanto, devido a dificuldades de realização de estudos *in vivo*, alguns modelos *in vitro* desta interação, têm sido desenvolvidos. Um teste que vem sendo amplamente utilizado é a avaliação da capacidade de ligação dos espermatozoides a agregados de células da tuba uterina cultivadas *in vitro* (FAZELI et al., 1999; IGNOTZ et al., 2001; CARVALHO, 2013).

Utilizando o modelo de agregados *in vitro*, tem sido demonstrado que espermatozoides de animais que possuem maior capacidade de se manter ligados a estas células, apresentam maior fertilidade (DE PAUW et al., 2002).

A ligação dos espermatozoides a estas células está relacionada à presença de espermatozoides viáveis e não capacitados (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Sendo assim, esse método consegue avaliar associadamente alguns fatores importantes, como a presença de espermatozoides que não sofreram capacitação seguida de reação acrossomal precoce, características estas desejáveis em uma amostra de sêmen de melhor qualidade.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Membrane Structure. In: **Molecular Biology of the Cell**. 3 ed.: Garland Publishing, New York. 1994. Cap. 10, p. 478-506.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoa function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. Cap. 80, p. 717-718.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; GARCIA, A.R.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; SOUZA, L.W.O.; Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. in **1º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA**, 1º, 2004. Londrina. p. 166–179, 2004.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática : momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.35, p.145–151, 2011.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ed. Ames, Iowa: Iowa State University, press, 1989. 285p.

BEDFORD, J.M. The status and the state of the human epididymis. **Human Reproduction**, v.9, p.2187-2199, 1994.

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; LEMES, A.P.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. et al. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p.1346–1351, 2009.

CARVALHO, J.O. **Aspectos moleculares, estruturais e funcionais de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2013. 98p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

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.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005. 186p. Tese (Doutorado)-Universidade de São Paulo, 2005.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 3ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

COOPER, T.G. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, p.533–539, 2007.

CRESPILHO, A.M. & PAPA, F.O. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p.213–222, 2010

DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. Contribution of Epididymal Secretory Proteins for Spermatozoa Maturation. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, p.7–17, 2003.

DACHEUX, J. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Review Reproduction**, v. 147, p.1470–1626, 2014.

DE PAUW, I.M.C.; SOOM, A.V.; LAESENS, H.; VERBERCKMOES, S.; KRUIF, A. Sperm Binding to Epithelial Oviduct Explants in Bulls with Different Nonreturn Rates Investigated with a New *In Vitro* Model. **Biology of Reproduction**, v. 67, p.1073–1079, 2002.

DESNOYERS, L. & MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 267, p.10149–10155, 1992.

FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Assessment of Pisum sativum Agglutinin in Identifying Acrosomal Damage in Stallion Spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, p.23–27, 1992.

FAZELI, A.; DUNCAN, A.E.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. Sperm-Oviduct Interaction : Induction of Capacitation and Preferential Binding of Uncapacitated Spermatozoa to Oviductal Epithelial Cells in Porcine Species. **Biology of Reproduction**, v. 60, p.879–886, 1999.

FLESCH, F.M. & GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p.197–235, 2000.

FRASER, L.R. & DRURY, L.M. Effect of removal of epididymal secretions on fertilization *in vitro* of mouse eggs. **Journal Reproduction Fertility**, v. 48, p.125–128, 1976.

GILBERT, S.F. **Biologia do Desenvolvimento** 5ed. São Paulo: FUNPEC, 2003. 918p.



GIRAUD, M.N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D.; GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, p. 2160-2164, 2000.

GOOVAERTS, I.G.F.; HOFLACK, G.G.; VAN SOOM A.; DEWULF, J.; NICHI, M.; KRUIF, A.; BOLS, P.E.J. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton – Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. **Theriogenology**, v. 66, p.323–330, 2006.

GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. **Theriogenology**, v. 41, p.1151–1162, 1994.

GUALTIERI, R.; MOLLO, V.; BARBATO, V. TALEVI, R. Ability of sulfated glycoconjugates and disulfide-reductants to release bovine epididymal sperm bound to the oviductal epithelium *in vitro*. **Theriogenology**, v. 73, p.1037–1043, 2010.

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; MUELLER, J.L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S.S. Bovine Seminal Plasma Proteins PDC-109 , BSP-A3, and BSP-30-kDa Share Functional Roles in Storing Sperm in the Oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 75, p.501–507, 2006.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

HAMMERSTEDT, H. R.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, P.N. Cryopreservation of Mammalian Sperm : What We Ask Them to Survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p.73-88, 1990.

HARKEMA, W.; COLENBRANDER, B.; ENGEL, B.; WOELDERS, H. Effects of exposure of epididymal boar spermatozoa to seminal plasma on the binding of zona pellucida proteins during *in vitro* capacitation. **Theriogenology**, v. 61, p.215–226, 2004.

HARRISON, R.A.; JACQUES, M.L.; MINGUEZ, M.L.; MILLER, N.G. Behaviour of ejaculated spermatozoa from bull , boar and ram during thin- layer countercurrent partition in aqueous two-phase systems. **Journal of Cell Science**, v. 102, p.123–132, 1992.

HEISE, A.; KAHN, W.; VOLKMANN, D.H.; THOMPSON, P.N.; GERBER, D.. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p.48–53, 2010.

HUNTER, R.H.F. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Capacitation of mammalian spermatozoa *in vivo*, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, p.243–250, 2004.

IGNOTZ, G.G.; LO, M.C.; PEREZ, C.L.; GWATHMEY, T.M.; SUAREZ, S.S. Characterization of a Fucose-Binding Protein from Bull Sperm and Seminal Plasma That May Be Responsible for Formation of the Oviductal Sperm Reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 64, p.1806–1811, 2001.

IGNOTZ, G.G.; CHO, M.Y.; SUAREZ, S.S. Annexins Are Candidate Oviductal Receptors for Bovine Sperm Surface Proteins and Thus May Serve to Hold Bovine Sperm in the Oviductal Reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 77, p.906–913, 2007.

JUYENA, N.S. & STELLETTA, C. Seminal Plasma : An Essential Attribute to Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, p.536–551, 2012.

KNOBIL, E. & NEILL, J. D., **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3ed. United of America: Elsevier, 2006. 3191p.

KRISHNAKUMAR, S.; WHITESIDE, D.P.; ELKIN, B.; THUNDATHIL, J.C. Evaluation of an animal protein-free semen extender for cryopreservation of epididymal sperm from North American bison (*Bison bison*). **Theriogenology**, v. 76, p.252–260, 2011.

MARTINS, C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 326–331, 2007.

MATÁS, C.; SANSEGUNDO, M.; RUIZ, S.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; GADEA, J.; ROMAR, R.; COY, P. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, p.1327–1340, 2010.

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p.225–232, 2009.

MAZIERO, R. R.; CRESPILO, A.M.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A.; PAPA, F.O. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p. 5–10, 2009.

MILLER, D. J.; WINER, A. M; AX, R. L. Heparin-Binding Proteins from Seminal Plasma Bind to Bovine and Modulate Capacitation by Heparin. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 899-915, 1990.

MORTIMER, S.T. CASA: Practical Aspects Andrology Lab Corner. **Journal of Andrology**, p.515–524 , 2000.

MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of Proteins in the Accessory Sex Gland Fluid Associated With Fertility Indexes of Dairy Bulls: A Proteomic Approach. **Journal of Andrology** , v. 27, p. 201-211, 2006.

PRADO, R.B. **Comparação de dois diluidores para o armazenamento de sêmen bovino utilizado na fecundação in vitro**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2009. 78p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009.

PURDY, P.H. & GRAHAM, J.K. Effect of Adding Cholesterol to Bull Sperm Membranes on Sperm Capacitation the Acrosome Reaction and Fertility. **Biology of Reproduction**, v. 71, p.522–527, 2004.

REGO, J.P.A.; CRISP, J.M.; MOURA, A.A.; NOUWENS, A.S.; LI, Y.; VENUS, B.; CORBET, N.J.; CORBET, D.H.; BURNS, B.M., BOE-HANSEN, G.B., MCGOWAN, M.R. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 148, p.1–17, 2014.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 68, p. 138–146, 2007.

ROVEGNO, M.; FEITOSA, W.B.; ROCHA, A.M.; MENDES, C.M.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.D.. Assessment of post-thawed ram sperm viability after incubation with seminal plasma. **Cell and Tissue Banking**, v. 14, p. 333–339, 2013.

SALING, P.M.; STOREY, B.T. Chlortetracycline as a Fluorescent Probe for the Mouse Sperm Acrosome Reaction. **Journal Cell Biology**, v. 83, p. 544-555, 1979.

SCHIMMING, B.C.; PINHEIRO, F.F.P.; VICENTINI, C.A.; DOMENICONI, R.F. Ultrastructure of the epithelium lining of cauda epididymidis in mongrel dogs 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p.32–36, 2012.

SELIGMAN, J.; KOSOWER, N.S.; SHALGI, R. Effects of caput ligation on rat sperm and epididymis: protein thiols and fertilizing ability. **Biology of Reproduction**, v.46, p.301-308, 1992.

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

SOUZA, C.E.A.; MOURA, A.A.; MONACO, E.; KILLIAN, G.J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1 / A2 , 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 72–89, 2008.

STOUT, M.A. **Comparision of epididymal and ejaculated sperm collected from the same holstein bulls**. Louisiana: Faculty of the Louisiana State University and agricultural and Mechanical Collage, 2012. 203p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) Agricultural and Mechanical Collage, 2012.

THÉRIEN, I.; MOUREAU, R.; MANJUNATH, P. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma and High-Density Lipoprotein induce Cholesterol Efflux from epididymal Sperm. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 768-776, 1998.

WOLFE, C.A.; JAMES, P.S.; MACKIE, A.R.; LADHA, S.; JONES, R. Regionalized Lipid Diffusion in the Plasma Membrane of Mammalian Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1506–1514, 1998.

## **CAPÍTULO 2**

## 1 INTRODUÇÃO

Material genético de animais de interesse econômico, animais selvagens ou em perigo de extinção pode ser perdido a qualquer momento por morte inesperada ou por incapacidade reprodutiva adquirida. Nestes casos, na maioria das vezes, é uma perda de material genético e também um prejuízo econômico (STOUT, 2012). Portanto, esforços devem ser feitos para evitar a perda definitiva desse material, o que pode ser viabilizado pelo uso de diferentes biotécnicas de reprodução assistida.

A recuperação de espermatozoides do epidídimo de animais mortos é uma alternativa viável para a preservação de gametas masculinos e também para a manutenção de bancos de germoplasma (KAABI et al., 2003; MARTINEZ-PASTOR et al., 2005). Esses espermatozoides podem ser utilizados na inseminação artificial (IA), ou na produção *in vitro* de embriões (PIV), seja por injeção intracitoplasmática (ICSI) ou por fecundação *in vitro* (FIV). Isto torna possível obter produtos de animais já mortos, recuperando assim material genético que de outra forma seria perdido (MARTINS et al., 2007; MARTINS et al., 2009). Estudos têm mostrado que é possível utilizar esse procedimento em bovinos, e o nascimento de bezerros Nelore frutos de IA, utilizando espermatozoides do epidídimo criopreservados, já foram relatados por Martins e colaboradores (2007).

Os espermatozoides do epidídimo são armazenados na cauda do epidídimo e no momento da ejaculação, entram em contato com os fluídos secretados pelas glândulas acessórias, formando o sêmen. Essas secreções das glândulas acessórias contêm vários fatores, incluindo íons, lipídeos, substratos energéticos, compostos orgânicos e proteínas (MOURA et al., 2006; JUYENA & STELLETTA, 2012), que são importantes para a sobrevivência e transporte do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea (JUYENA &

STELLETTA, 2012). Além disso, proteínas secretadas no plasma seminal são fundamentais para a estabilidade da membrana, formação do reservatório do istmo, capacitação espermática e interação espermatozoide-ovócito. Portanto, os espermatozoides do epidídimo, diferem daqueles do ejaculado, principalmente por não terem entrado em contato com os fluidos das glândulas acessórias. E, por sua vez, não tiveram contato com substâncias importantes para a sobrevivência, o que pode afetar a fisiologia e longevidade dessas células.

Os espermatozoides provenientes do epidídimo podem ser utilizados frescos logo após a coleta, assim como refrigerados a 5°C, o que garante sua preservação temporária, mantendo-os viáveis por mais tempo (MARTINS et al., 2007; BERTOL, 2012). Outra possibilidade é a criopreservação destes espermatozoides, tornando o seu uso mais prático, por poder ser utilizado a qualquer momento, não apenas imediatamente após a morte do animal (MARTINS et al., 2007). Entretanto, a criopreservação é um processo que resulta em injúrias à célula espermática, seguida de queda de fertilidade (WATSON, 2000; CELEGHINI et al., 2007). Apesar de Stout (2012) ter relatado que espermatozoides do epidídimo apresentaram maior resistência ao processo de criopreservação quando comparado aos do ejaculado, pouco se sabe sobre o comportamento desses espermatozoides frente a processos de estresse como a refrigeração e a criopreservação. Portanto, conhecer o comportamento desses espermatozoides podem esclarecer alguns mecanismos ainda não elucidados relacionados às diferenças nas características fisiológicas entre espermatozoides do ejaculado e do epidídimo. Além disto, estes conhecimentos são de fundamental importância para aperfeiçoar o uso desses gametas seja na IA, TE ou PIV.

Este estudo objetivou avaliar a qualidade, a longevidade e a capacidade de espermatozoides de epidídimo criopreservados de se ligarem *in vitro* nas células da tuba uterina.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes

A menos que indicado, os reagentes utilizados para este estudo, foram adquiridos da Sigma (Sto. Louis, MO, USA).

### 2.2 Animais experimentais

Foram utilizados espermatozoides do ejaculado e do epidídimo de sete touros da raça Gir (*Bos indicus*), com idade entre 36 e 40 meses, criados em sistema semi-extensivo, alimentados com pastagem (*Brachiara brizantha*), sal mineral e água *ad libitum* na fazenda experimental Sucupira. Previamente ao experimento, os animais foram selecionados através de três exames andrológicos, com inspeção e palpação dos órgãos genitais e glândulas anexas. Todos os animais selecionados apresentavam sêmen com motilidade total  $\geq 70\%$  e com o mínimo de 70% de células morfolologicamente normais, seguindo os critérios do CBRA (2013). Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Protocolo CEUA-Cenargen 06/2013).

### 2.3 Coleta e criopreservação dos espermatozoides do ejaculado e do epidídimo

A coleta do sêmen foi realizada pelo método de eletroejaculação, sendo coletado um ejaculado de cada animal. Sete a 15 dias após a coleta do ejaculado, os animais foram submetidos à orquiectomia bilateral, e os testículos foram mantidos por duas horas a 5°C, simulando o tempo comumente requerido para o transporte do local da coleta até o laboratório. Os testículos foram higienizados com solução salina (NaCl 0,9%) e álcool 70%, sendo realizada a coleta dos espermatozoides da cauda do epidídimo pelo método de extravasamento (MARTINEZ-PASTOR et al., 2006).

Após a coleta do sêmen e a recuperação dos espermatozoides do epidídimo (Figura 1), ambos foram criopreservados. Como diluidor foi utilizado meio Tris-citrato-gema-glicerol Dilutris® (SEMENCON – Produtos Agropecuários Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil) na proporção de 1:1 para o ejaculado e na proporção de 1:4 para os espermatozoides epididimários, devido a sua maior concentração. Após a diluição, foi retirada uma amostra do ejaculado e uma do epidídimo de cada animal para avaliação. O restante foi envasados à uma concentração de 25 a 30x10<sup>6</sup> espermatozoides/palheta de 0,25 mL. Foi possível observar em todos os animais que a concentração de espermatozoides recuperados da cauda de um epidídimo foi semelhante à concentração do ejaculado. A média de palhetas obtidas foi de 150 do ejaculado e 150 do epidídimo, por animal. As palhetas foram então, mantidas em balcão refrigerado (Minitübe, Porto Alegre, RS, Brasil) à temperatura constante de 5°C por 4 horas, para o período de resfriamento. Após o período de resfriamento, uma palheta de cada grupo (ejaculado e epidídimo) por animal foi retirada para avaliação. O restante das palhetas foi colocado em curva de estabilização em vapor de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>L). Para isso as palhetas foram acondicionadas em caixa de isopor convencional a uma distância fixa de quatro cm acima do nível do N<sub>2</sub>L, e mantidas por 20 minutos. Decorrido o período de estabilização, as palhetas foram imersas no N<sub>2</sub>L para congelação sendo armazenadas em botijão criogênico. Para avaliação as palhetas foram descongeladas a 37°C por 30 segundos em banho-maria.



## 2.4 Coleta e criopreservação dos espermatozoides do epidídimo obtidos de animais de abatedouro

Nesse estudo também foram utilizados espermatozoides recuperados do epidídimo de testículos de touros *Bos Indicus*, oriundos de abatedouro local. Imediatamente após o abate do animal os testículos foram retirados e transportados em gelo a 5° C por um período de aproximadamente duas horas. No laboratório os testículos foram higienizados com solução salina (NaCL 0,9%) e álcool 70%, sendo realizada a coleta dos espermatozoides da cauda do epidídimo pelo método de extravasamento. Uma parte dos espermatozoides coletados foi criopreservada, conforme descrito anteriormente, e outra parte foi utilizada fresca.

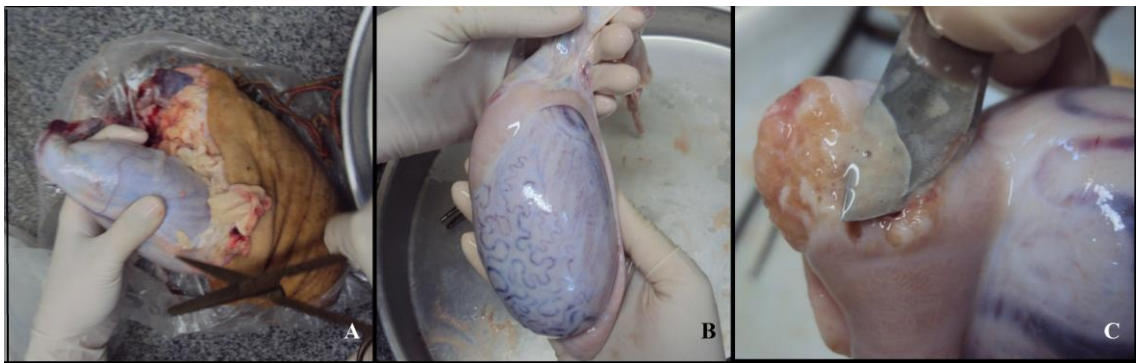


Figura 1. Testículo sendo retirado da bolsa escrotal (A); Testículo limpo, sem a túnica vaginal (A); coleta dos espermatozoides da cauda do epidídimo através do método de extravasamento (C).

## 2.5 Coleta e processamento de plasma seminal

Sêmen de outros quatro touros *Bos indicus* foi coletado pelo método de eletroejaculação e feito um pool. O pool de ejaculados foi imediatamente centrifugado a 1400 x g por 10 min. O pellet contendo os espermatozoides foi retirado e mais uma centrifugação foi realizada a 1400 x g por 5 min. O sobrenadante contendo o plasma seminal foi retirado e filtrado em filtro de membrana Millipore (Merck, Cotia, SP, Brasil) com poros de 20 µm. Após a filtragem, foram feitas alíquotas em microtubos de 1,7 mL, que foram colocadas diretamente em nitrogênio líquido e armazenadas até a utilização.

## 2.6 Avaliações da motilidade e morfologia espermática

A análise da motilidade foi realizada no sistema CASA (Sperm Analysis System, IvoS- Ultimate 12's, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA), com *setup* previamente ajustado para análise de espermatozoide bovino. Para avaliação, 8  $\mu\text{L}$  de sêmen foram colocados na lâmina de leitura (Makler, Santa Ana, CA, USA) aquecida. No mínimo três campos foram selecionados manualmente para a leitura e análise. Os parâmetros de cinética espermática mensurados foram: motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) em porcentagem; velocidade de trajeto (VAP), velocidade retilínea (VSL), e velocidade curvilínea (VCL) em micrômetro por segundo; amplitude lateral de cabeça (ALH) em micrômetro; frequência de batimentos (BCF) em Hz; e linearidade (LIN), em porcentagem.

A avaliação da morfologia espermática foi realizada em microscopia de contraste de fase em preparação úmida, sendo contados 200 espermatozoides por lâmina conforme as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

## 2.7 Avaliação da capacitação

Para avaliação da capacitação espermática, foi utilizada técnica de coloração com hidróclorido de clortetraciclina (CTC), modificado de Cormier et al., (1997). Amostra de sêmen (10  $\mu\text{L}$ ) foi diluída em uma solução de corante de CTC (15  $\mu\text{L}$ ) (Anexo A). Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de solução de corante com sêmen foi colocada sobre uma lâmina e coberta com uma lamínula. A amostra foi mantida em uma placa de petri fechada, sob um papel umedecido em água, para manter a umidade, protegida da luz à temperatura de 5°C por toda noite. No dia seguinte as lâminas levadas ao microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: Filtro de comprimento de onda 494/517 excitação/emissão), e 200 células espermáticas foram avaliadas. Foram considerados capacitados os espermatozoides que apresentaram ausência ou baixa fluorescência na região pós acrossomal e fluorescência brilhante na região acrossomal (Figura 2).



Figura 2- Espermatozoide corado com hidróclorido de clotertraciclina (CTC) apresentando ausência ou baixa fluorescência na região pós acrossomal e fluorescência brilhante na região acrossomal (padrão de célula capacitada), observado em microscópio de epifluorescência em aumento de 100x (CARVALHO, 2009).

## 2.8 Avaliação da integridade da membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática foi avaliada utilizando o diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA) associado ao iodeto de propídeo (IP) (Molecular Probe<sup>®</sup>, Eugene, Oregon, EUA), conforme descrição de Harrison e Vickers (1990). Uma amostra de sêmen (10  $\mu$ L) foi adicionada à solução de corante (40  $\mu$ L) (Anexo B) e incubada por 10 minutos em microtubo protegido da luz. Uma alíquota de 10  $\mu$ L de solução de corante com sêmen foi colocada em uma lâmina coberta com uma lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: filtro de comprimento de onda de 395/420 nm excitação/emissão). Foram avaliadas 200 células espermáticas sendo classificadas de acordo com a membrana plasmática em: membrana íntegra (presença de coloração verde na cabeça); membrana semi-lesada (presença de coloração verde e vermelha na cabeça); membrana lesada (presença de coloração vermelha na cabeça) (Figura 3). Para fins de análise utilizaram-se os percentuais de espermatozoides com membrana íntegra.

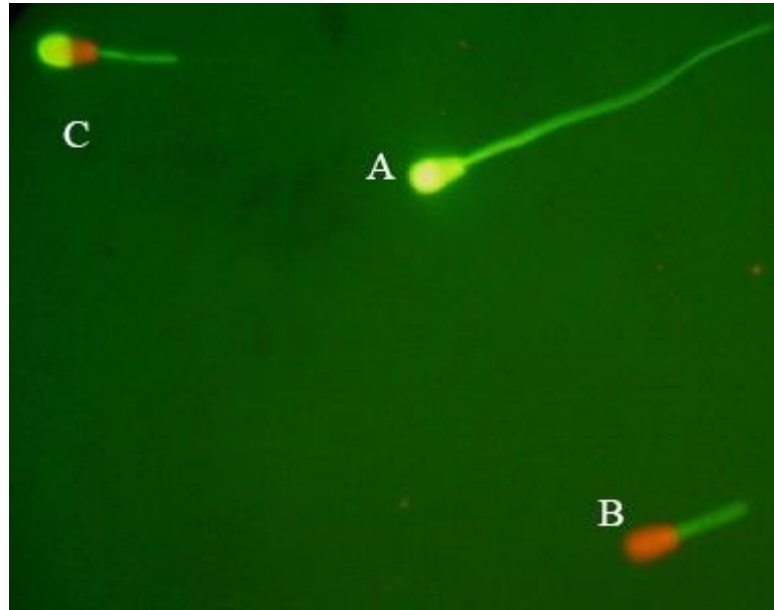


Figura 3- Espermatozoide corado com diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídeo (IP), apresentando membrana plasmática íntegra (A), membrana plasmática lesada (B) e membrana plasmática semi-lesada (C), observado em microscópio de epifluorescência em aumento de 40x (CARVALHO, 2009).

## 2.9 Avaliação da integridade acrossomal

A integridade do acrossoma foi avaliada utilizando uma conjugação de isotiocianato de fluoresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (*peanut agglutinin* – PNA, Molecular Probe®, Eugene, Oregon, EUA) associado ao IP, como descrito por Klinc e Rath (2007). Amostra de sêmen (10  $\mu$ L) foi diluída em uma solução de corante (40  $\mu$ L) (Anexo C) e incubada por 10 minutos. Uma alíquota de 10  $\mu$ L de solução de corante com espermatozoides foi colocada sobre uma lâmina e coberta com uma lamínula. Foram avaliadas 200 células espermáticas em microscópio de contraste de fase e microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: Filtro de comprimento de onda 494/517 excitação/emissão). Os espermatozoides foram classificados em quatro categorias, sendo: morto com acrossoma íntegro (presença de coloração vermelha na cabeça e ausência de coloração no acrossoma); morto com acrossoma reagido (presença de coloração vermelha na cabeça e verde no acrossoma); vivo com acrossoma íntegro (ausência de coloração na cabeça e acrossoma); vivo com acrossoma reagido (ausência de coloração na cabeça e presença de coloração verde no acrossoma) (Figura 4).

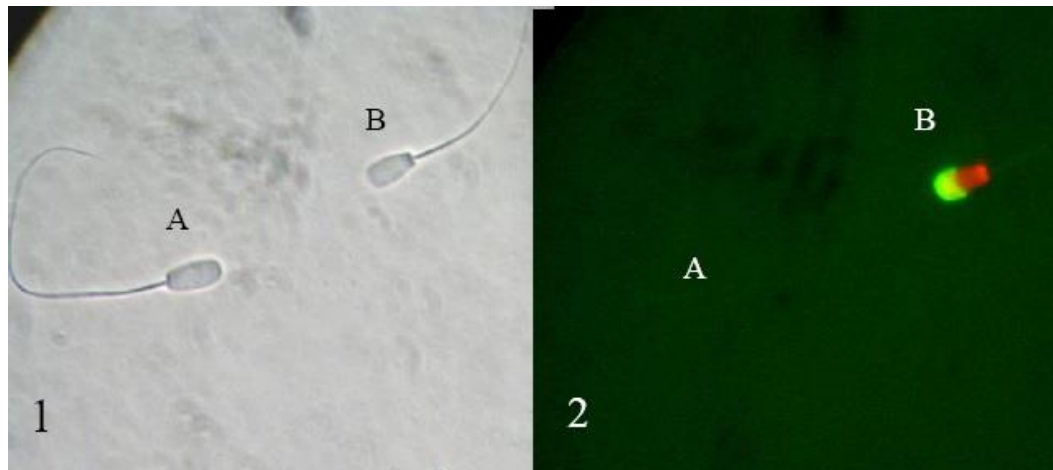


Figura 4- Fotografia em microscopia de contraste de fase (1) e epifluorescência (2) do mesmo campo de leitura. Espermatozoide vivo com acrossoma íntegro (A) visualizado em contraste de fase (1) não se apresenta corado com a conjugação de isotiocianato de fluoresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (*peanut agglutinin* – PNA) e iodeto de propídeo (IP) quando avaliado em epifluorescência (2). Espermatozoide morto com acrossoma reagido (B) visualizado no contraste de fase (1) apresenta-se corado com IP-PNA em epifluorescência (2) em aumento de 40x (CARVALHO, 2009 ).

## 2.10 Coleta e processamento das células da tuba uterina

Os agregados celulares foram coletados e processados de acordo os procedimentos descritos por De Pauw et al. (2002) e Kardivel et al (2012) com modificações. Para cada dia de manipulação, 10 a 15 tubas uterinas foram coletadas imediatamente após o abate e, transportadas para o laboratório em solução salina (NaCl 0,9%) suplementada com penicilina G (100UI/mL) e sulfato de estreptomicina (50µg/mL) à 35°C. No laboratório as tubas uterinas foram dissecadas de tecidos adjacentes e lavadas com meio de lavagem que consistia de TCM-199 com sais de Hank's (Gibco BRL, Burlington, ON, Canadá), suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e 0,075 mg/mL de amicacina. Após a dissecação, as células foram coletadas da região do istmo, considerando até quatro centímetros a partir da junção útero-tubárica. Para recuperação das células, o istmo dissecado era imerso em meio de lavagem e utilizando o bordo de uma lâmina de vidro era aplicada uma pressão contínua sobre o mesmo induzindo a saída das células por uma de suas extremidades (Figura 5). Após a coleta, as células foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL, sendo lavadas duas vezes com 5-10 mL de meio com *Tyrode's Albumin Lactate and Pyruvate* [(SP-TALP) PARRISH

et al., 1995]. Entre as lavagens, as células foram desagregadas com uma pipeta automática de 10 mL (após a primeira lavagem) ou escalpe de 19 gauge acoplado a uma seringa de 10 mL (após a segunda lavagem). As células desagregadas foram transferidas para uma placa de petri de 100 mm com volume final de 25 mL de meio SP-TALP e, mantidas em cultivo por aproximadamente 24 h a 39°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar para a formação de agregados celulares (Figura 6). Entre as 6 e 8 h após o início do cultivo era realizada uma troca de meio. Após 20 a 24 horas de cultivo os agregados contendo entre 50 e 480 µm de perímetro foram selecionados.

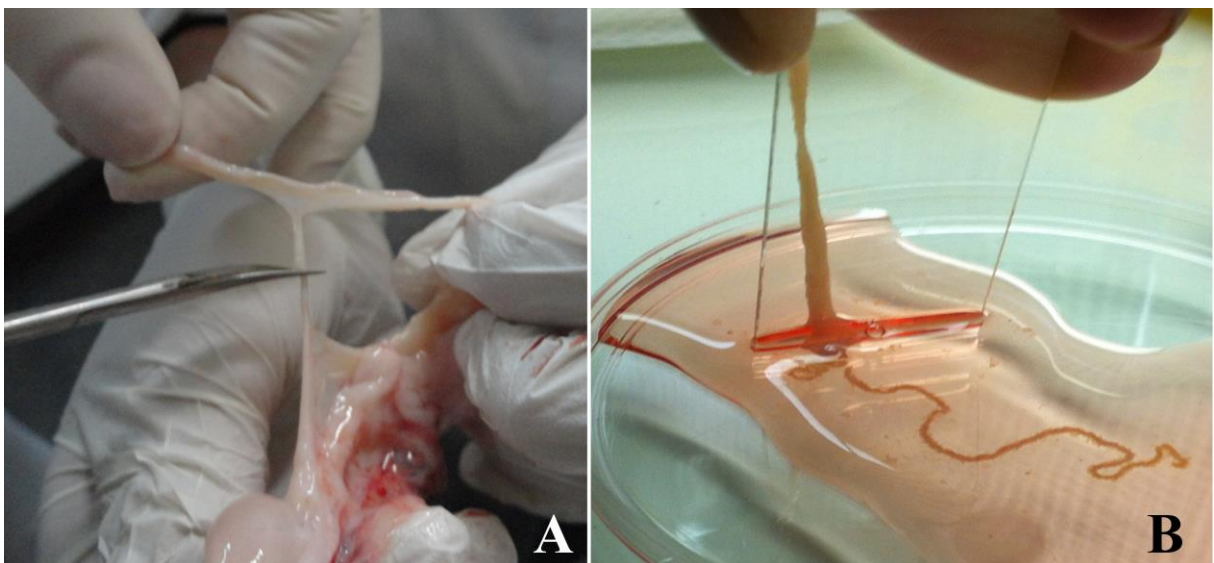


Figura 5- Fotografia da dissecação da tuba uterina de bovinos (A) momento em que as células da luz do istmo são retiradas utilizando o bordo de uma lâmina de vidro induzindo a saída das células por uma de suas extremidades (B).

### **2.11 Teste de ligação e avaliação do número de espermatozoides ligados às células da tuba uterina**

Para a realização do teste cerca de 30 agregados esféricos, eram colocados em gotas de 50 µL de SP-TALP, sob óleo de silicone. Uma palheta de sêmen foi descongelada à 37°C por 30 segundos, sendo selecionados através de gradiente de Percoll (GE Healthcare Bio Science, Uppsala, Suécia), constituído de 400 µL de Percoll 45% e 400 µL de Percoll 90%, e centrifugadas a 700 g por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet centrifugado por 5 min. O pellet resultante foi ressuspensionado com SP-TALP. Após a

seleção, foi feita uma contagem dos espermatozoides em hematocítmetro, e esses foram adicionados nas gotas de incubação em uma concentração final de  $0,5 \times 10^6$  espermatozoides móveis/mL. Espermatozoides e agregados celulares foram incubados por 30 min., 6 e 24 h em estufa a 39 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

Após incubação, os complexos agregados-espermatozoides foram transferidos para uma gota de 30 µL de meio SP-TALP sobre uma lâmina de vidro para captação das fotos. Para cada complexo agregado-espermatozoide (Figura 6) foram feitas duas fotografias utilizando câmera digital Zeiss Axioskop e Axio Cam HRc (Carl Zeiss, Thornwood, NY). O número de espermatozoides ligados e o perímetro de cada agregado, foram avaliados utilizando AxioVision V 4.5 software (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA). O número de espermatozoides ligados por milímetro (mm) de agregado foi calculado dividindo-se o número de espermatozoides ligados pelo perímetro do agregado.

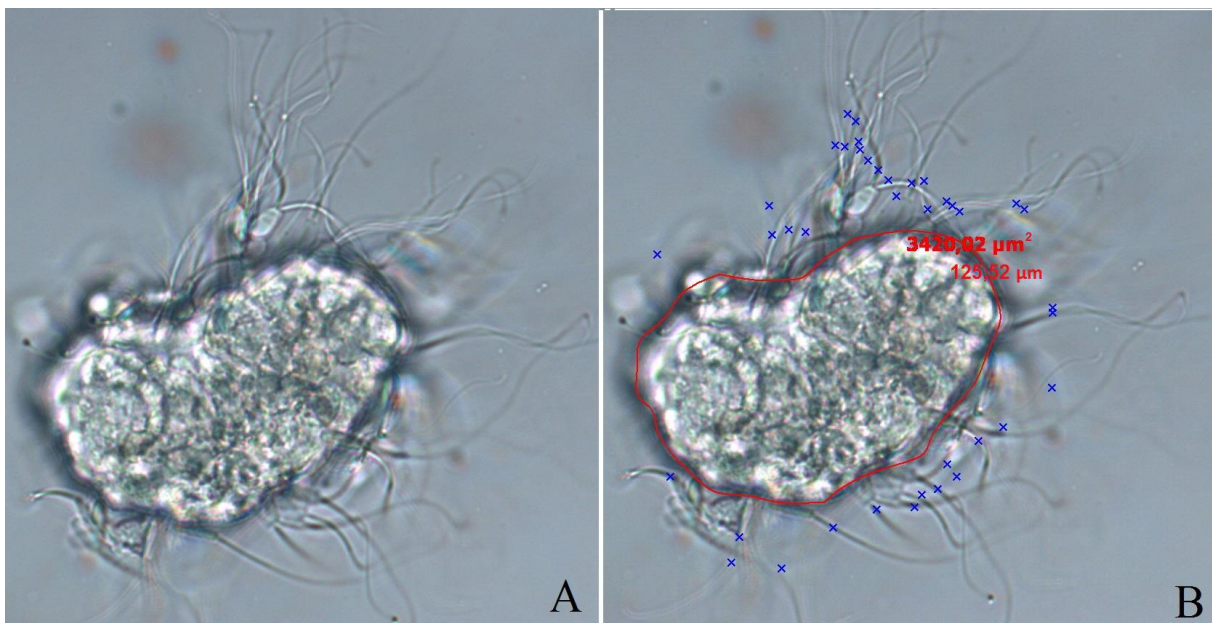


Figura 6- Fotografia de contraste de fase em aumento de 40x do complexo agregado células da tuba uterina-espermatozoides após 30 minutos de co-incubação com espermatozoides recuperados do epidídimo (A) e após a contagem dos espermatozoides (marcados com um x em azul) e medição do perímetro de agregado (linha em vermelho) para avaliação do número de espermatozoides ligados por mm de agregado (B).

## **2.12 Delineamento experimental**

### **2.12.1 Experimento 1. Comparação entre espermatozoides do epidídimo e ejaculado quanto à resistência a refrigeração e a criopreservação**

Esse experimento teve como objetivo avaliar a resposta dos espermatozoides do epidídimo à refrigeração e criopreservação. Para isso, espermatozoides do ejaculado (EJ) e epidídimo (EP) foram avaliados em três diferentes momentos: imediatamente após a diluição (células frescas), após 4 horas de refrigeração (células refrigeradas) e após a criopreservação (células congeladas).

Em cada momento foi avaliada uma palheta de cada animal, quanto à motilidade total e motilidade progressiva, morfologia espermática, integridade de membrana plasmática e integridade de membrana acrossomal.

### **2.12.2 Experimento 2. Avaliação da viabilidade e longevidade de espermatozoides do epidídimo criopreservados**

Neste experimento a longevidade dos espermatozoides do epidídimo após a criopreservação foi caracterizada. Foram utilizados três grupos: espermatozoides do epidídimo criopreservados (EP), espermatozoides do ejaculado criopreservados (EJ) e espermatozoides do epidídimo criopreservados e exposto ao plasma seminal após descongelamento (EPP). Amostras de espermatozoides do ejaculado e do epidídimo foram descongelados e, para constituir o grupo EPP os espermatozoides do epidídimo foram incubados por dez minutos à 39°C em plasma seminal previamente congelado. Espermatozoides dos três grupos foram selecionados em gradiente de Percoll, de acordo com o item 2.11. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet centrifugado por 5 min., o pellet resultante foi ressuspensionado em meio SP-TALP, para se obter uma concentração final de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Os espermatozoides foram então incubados a 39°C e 5% CO<sub>2</sub>. Amostras dos três grupos (EJ, EP EPP) foram retiradas às 0, 3, 6 e 24 horas de incubação e avaliadas quanto à motilidade total e progressiva, integridade de membrana plasmática, integridade acrossomal, capacitação espermática e morfologia.



### **2.12.3 Experimento 3. Avaliação da capacidade dos espermatozoides criopreservados do epidídimo de se ligarem as células da tuba uterina**

Na primeira etapa do experimento, foi avaliada a capacidade dos espermatozoides do epidídimo, de se ligarem às células da tuba uterina (CTU), sendo utilizados espermatozoides do ejaculado como controle. Logo após o descongelamento espermatozoides dos dois grupos (EP e EJ) foram selecionados em gradiente de Percoll conforme descrito no experimento 2. Posteriormente, foram transferidos para gotas (três gotas/amostra) de SP-TALP contendo os agregados de células do istmo e co-incubados por 30 min., 6 e 24 horas. No final de cada período de incubação o número de espermatozoides ligados por mm de agregados celulares foram calculados.

Considerando que a criopreservação pode causar alterações na superfície da membrana espermática modificando proteínas envolvidas na formação do reservatório do istmo (ARDON & SUAREZ, 2013), em uma segunda etapa este experimento, foi avaliado se a criopreservação afetava a ligação dos espermatozoides às CTU. Para isto, foram utilizados testículos de quatro touros *Bos Indicus* coletados em abatedouro local e transportados até o laboratório a 5 °C. Um testículo de cada animal foi utilizado para o grupo de espermatozoides do epidídimo criopreservados (EP-C) e o outro para o grupo de espermatozoides do epidídimo frescos (EP-F). Os espermatozoides foram recuperados, e os do grupo EP-F foram imediatamente diluídos em solução salina previamente aquecida e, utilizados para o teste de ligação. Os do grupo EP-C foram criopreservados, de acordo como descrito no item 2.4. O teste de ligação as CTU para ambos os grupos foi realizado de acordo com o descrito na primeira etapa deste experimento.

### 2.13 Análise estatística

Para análise estatística das variáveis relacionadas às avaliações espermáticas nos diferentes momentos de incubação e número de espermatozoides ligados às CTU, foi utilizada uma estrutura de médias repetidas com sujeito definido como touro\*tratamento\*tempo de incubação. Quando não houve efeito de tratamento e interação tratamento\*tempo de incubação, a média marginal para cada grupo nos diferentes momentos também foi apresentada. Na análise estatística utilizou-se o procedimento GLIMMIX (análise de variância) do programa SAS, sob a metodologia dos modelos lineares generalizados considerando para as variáveis de contagem uma Poisson, com funções logarítmicas. As comparações estatísticas foram realizadas sobre as médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão (EP), utilizando uma réplica por touro, sendo cada touro considerado uma repetição. A comparação foi feita utilizando teste de Tukey-Kramer com nível de significância de  $\alpha=0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Experimento 1. Comparação entre espermatozoides do epidídimo e do ejaculado quanto à resistência à refrigeração e criopreservação

Os espermatozoides do epidídimo frescos e criopreservados apresentaram MT e MP semelhante aos do ejaculado ( $P>0,05$ ). Entretanto, nenhuma diferença na MT e MP foi observada em espermatozoides do epidídimo antes e após o resfriamento. Em contraste, os espermatozoides do ejaculado apresentaram uma queda significativa tanto na MT quanto na MP após o período de resfriamento (Tabela 1). A percentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossoma íntegros foi semelhante para espermatozoides frescos, refrigerados e criopreservados do EJ e EP. Entretanto, assim como para a motilidade, o grupo EJ apresentou uma queda significativa em ambos os parâmetros após a refrigeração, enquanto no grupo EP essa queda só ocorreu após a criopreservação (Tabela 1). Outra característica avaliada foi a percentagem de espermatozoides normais. Os resultados mostraram que a percentagem de espermatozoides com alterações morfológicas aumentou após a criopreservação, mas não após a refrigeração em ambos os grupos [(EP e EJ) Tabela 1)].

Tabela 1. Porcentagem (média±EP) de espermatozoides móveis, com motilidade progressiva, membrana plasmática íntegra, vivos com acrossomal íntegro, morfologicamente normais em amostras do ejaculado (EJ) e do epidídimo (EP) imediatamente após a coleta (fresco), após refrigeração à 5°C por 4 h e após criopreservação.

<b>Grupo</b>	<b>Momento</b>	<b>Motilidade total</b>	<b>Motilidade progressiva</b>	<b>Membrana íntegra</b>	<b>Vivo acrossoma íntegro</b>	<b>Morfologia normal</b>
<b>EJ</b>	Fresco	87,5±1,3 <sup>a,A</sup>	50,6±1,8 <sup>a,A</sup>	74,6±1 <sup>a,A</sup>	69,4±3,7 <sup>a,A</sup>	89,1±1 <sup>a,A</sup>
<b>EJ</b>	Refrigerado	56,8±5,6 <sup>b,A</sup>	29,2±3,2 <sup>b,A</sup>	56,2±5,6 <sup>b,A</sup>	48,5±6,1 <sup>b,A</sup>	91,0±1 <sup>a,A</sup>
<b>EJ</b>	Criopreservado	48,3±4,2 <sup>b,A</sup>	25,9±3,8 <sup>b,A</sup>	41,3±5,9 <sup>b,A</sup>	40,5±8,9 <sup>b,A</sup>	82,2±2 <sup>b,A</sup>
<b>EP</b>	Fresco	86,1±1,3 <sup>a,A</sup>	57,5±1,8 <sup>a,B</sup>	77,0± <sup>a,A</sup>	69,8±3,7 <sup>a,A</sup>	88,8±1 <sup>a,A</sup>
<b>EP</b>	Refrigerado	79,8±4,5 <sup>a,B</sup>	46,1±3,5 <sup>b,B</sup>	69,7±5,2 <sup>a,A</sup>	68,7±5,8 <sup>a,B</sup>	87,8±1 <sup>a,A</sup>
<b>EP</b>	Criopreservado	54,4±4,1 <sup>b,A</sup>	35,2±4,1 <sup>c,A</sup>	50,0±6 <sup>b,A</sup>	45,2±9,3 <sup>b,A</sup>	82,5±2 <sup>b,A</sup>

<sup>a,b</sup>Médias seguidas de letras iguais nas colunas não difere entre os diferentes momentos, dentro dos mesmos grupos a 5% de probabilidade.

<sup>A,B</sup>Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem os grupos EJ e EP dentro do mesmo momento. a 5% de probabilidade.

### **3.2 Experimento 2. Avaliação da viabilidade e longevidade de espermatozoides do epidídimo criopreservados**

A motilidade total foi semelhante em todos os grupos, independente do tempo de incubação (Figura 7). Até as 6 horas de incubação a queda mais acentuada foi observada para os espermatozoides do EJ, enquanto que para os do epidídimo (EP e EPP), a MT foi semelhante àquela observada às zero horas. Entretanto às 24 horas a MT foi semelhante ( $P>0,05$ ) para todos os grupos. Da mesma forma, a motilidade progressiva não foi afetada pelo grupo (EJ, EP e EPP), sendo similar entre eles em todos os momentos de avaliação. Além disso, apesar da média marginal mostrar que às 3h de incubação já ocorria uma queda significativa na motilidade progressiva, a que nos grupos EPP e EP essa queda só foi significativas após as 6 horas de incubação (Figura 7).

Quanto à morfologia espermática, não foi encontrado efeito dos grupos de espermatozoides nos diferentes momentos de incubação (Figura 8). Além disto, o grupo EP apresentou porcentagem de espermatozoides normais semelhante ao longo de todo o período de incubação. Para os grupos EJ e EPP, foi encontrada menor porcentagem de espermatozoides normais somente após 24 h de incubação em relação a 0 h.

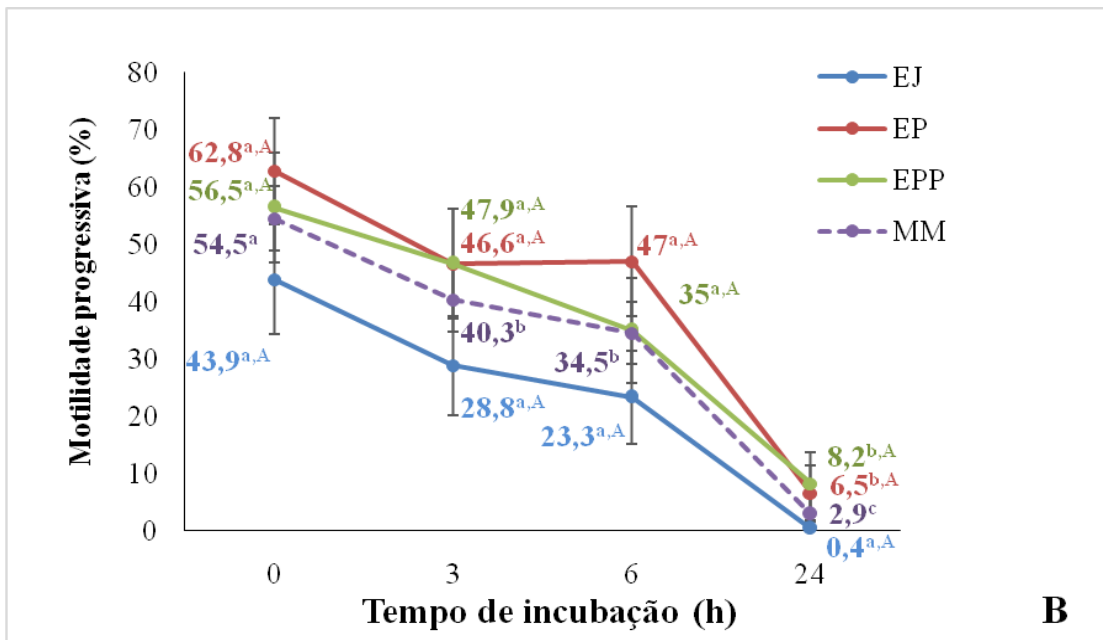
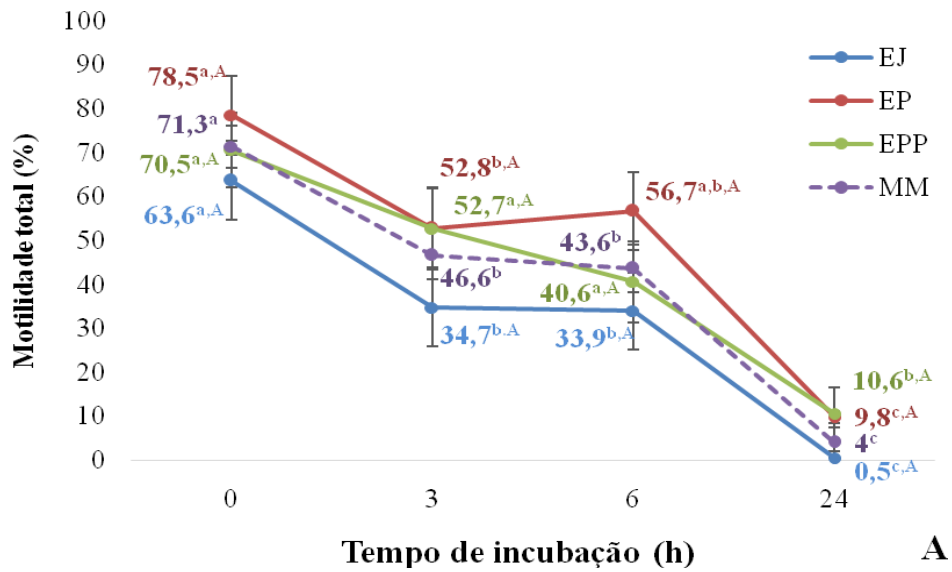


Figura 7 – Porcentagem total de espermatozoides móveis (A) e com motilidade progressiva (B) do ejaculado (EJ), do epidídimo (EP), do epidídimo + plasma seminal (EPP) e média marginal (MM) após o descongelamento nos períodos de 0 h, 30 min 6 h e 24 h de incubação.. Média obtida a partir de uma réplica por touro (n=7). <sup>A,B</sup>Diferença significativa entre grupos a cada momento de incubação ( $P \leq 0,05$ ). <sup>a,b</sup> Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo ( $P \leq 0,05$ )

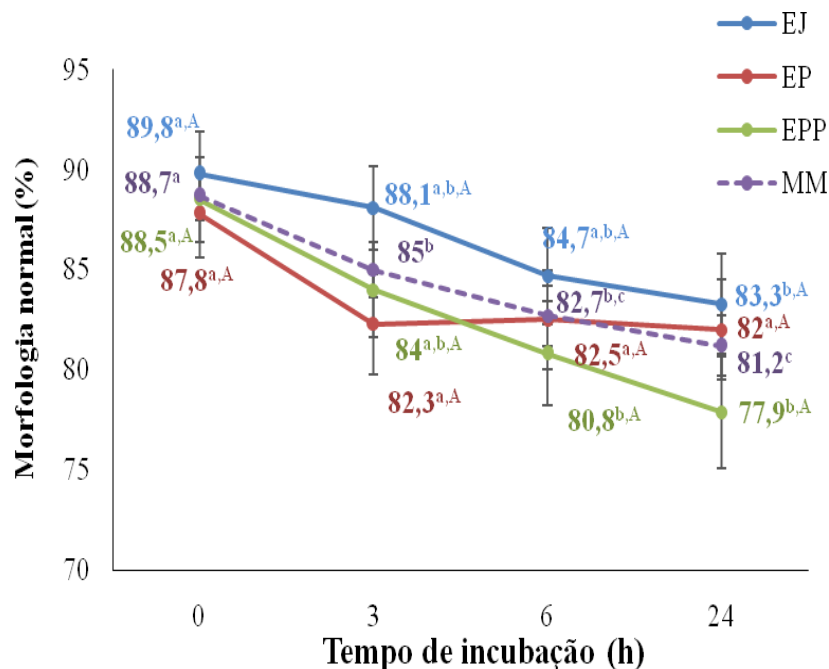


Figura 8 – Porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais do ejaculado (EJ), do epidídimo (EP), do epidídimo + plasma seminal (EPP) e média marginal (MM) após o descongelamento e incubação nos períodos de 0 h, 30 min 6 h e 24 h de incubação. Média obtida a partir de uma réplica por touro (n=7). <sup>A,B</sup>Diferença significativa entre grupos a cada momento de incubação ( $P \leq 0,05$ ). <sup>a,b</sup>Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo ( $P \leq 0,05$ ).

A porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (MPI) após descongelamento e as 3 h de incubação foi semelhante ( $P > 0,05$ ) entre os grupos. Entretanto, após 6 h de incubação espermatozoides do grupo EP e EPP apresentaram maior porcentagem espermatozoides com MPI do que o grupo EJ (Figura 9). Em relação à porcentagem de espermatozoides com MPI nos diferentes tempos de incubação, observou-se uma queda em todos os grupos as 3 horas, com uma maior diminuição às 6h de incubação apenas no grupo EJ (Figura 9). Assim como na integridade acrossomal, não foi identificada diferença entre os grupos na porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro após o descongelamento. Entretanto, foi identificado menor porcentagem destes espermatozoides às 3 e 6 h de incubação no grupo EJ em relação aos grupos EP e EPP (Figura 10). Ao se avaliar a integridade acrossomal de cada grupo durante o período de incubação, foi identificada uma queda em todos os grupos após 3 h de incubação, se mantendo às 6 h, e uma maior diminuição as 24 h de incubação (Figura 10).

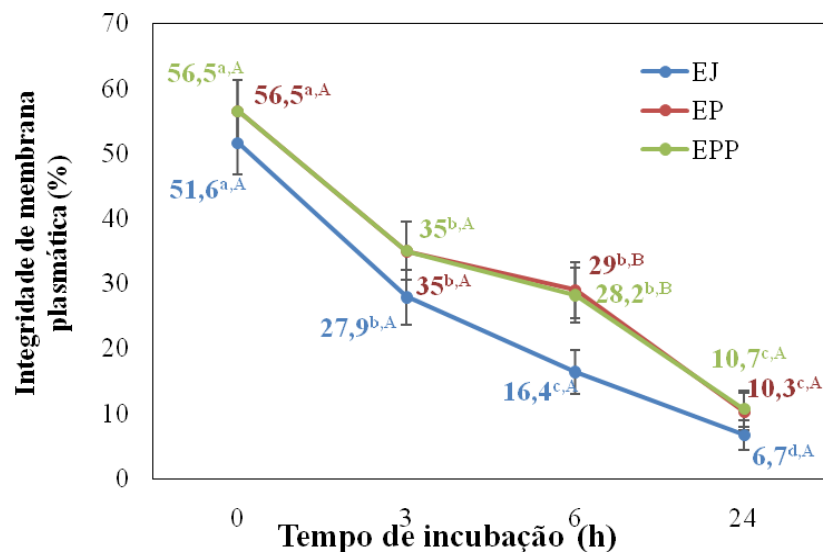


Figura 9 – Porcentagem de membrana íntegra de espermatozoides do ejaculado (EJ), do epidídimo (EP), do epidídimo + plasma seminal (EPP) após o descongelamento e incubação nos períodos de 0 h, 30 min 6 h e 24 h de incubação. Média obtida a partir de uma réplica por touro (n=7). <sup>A,B</sup>Diferença significativa entre grupos a cada momento de incubação ( $P \leq 0,05$ ). <sup>a,b</sup>Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo ( $P \leq 0,05$ ).

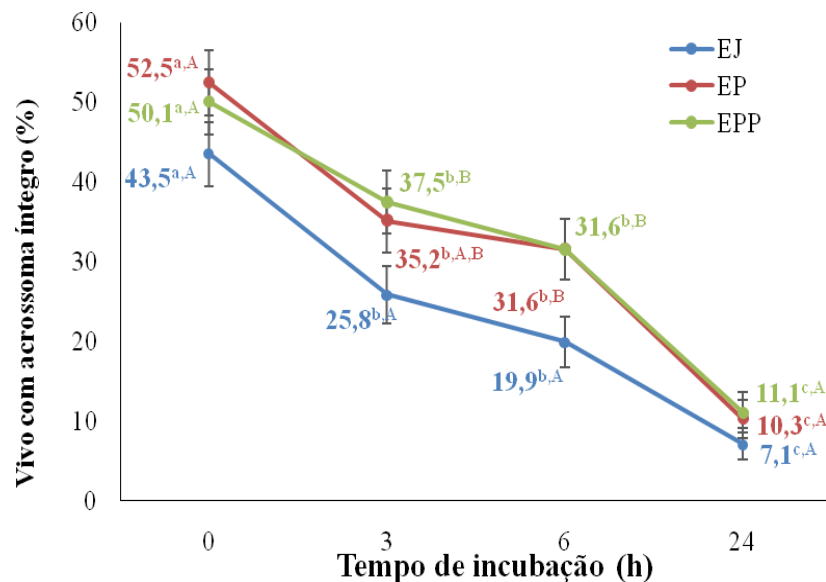


Figura 10 – Porcentagem de espermatozoides do ejaculado (EJ), do epidídimo (EP), do epidídimo + plasma seminal (EPP) vivos sem reação no acrossoma. Após o descongelamento e incubação nos períodos de 0 h, 30 min 6 h e 24 h de incubação. Média obtida a partir de uma réplica por touro (n=7). <sup>A,B</sup>Diferença significativa entre grupos a cada momento de incubação ( $P \leq 0,05$ ). <sup>a,b</sup>Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo ( $P \leq 0,05$ ).



O grupo EP e EPP apresentaram uma maior porcentagem de espermatozoides não capacitados do que o grupo EJ às 6 e 24 h (Figura 11). Ao se comparar cada grupo durante a incubação, observou-se que espermatozoides do ejaculado e epidídimo apresentaram diminuição na porcentagem de espermatozoides não capacitados após 3 h de incubação, se mantendo semelhante até as 24 h. Para o grupo EPP não foi observado efeito do tempo de incubação sobre a porcentagem de espermatozoides capacitados (Figura 11).

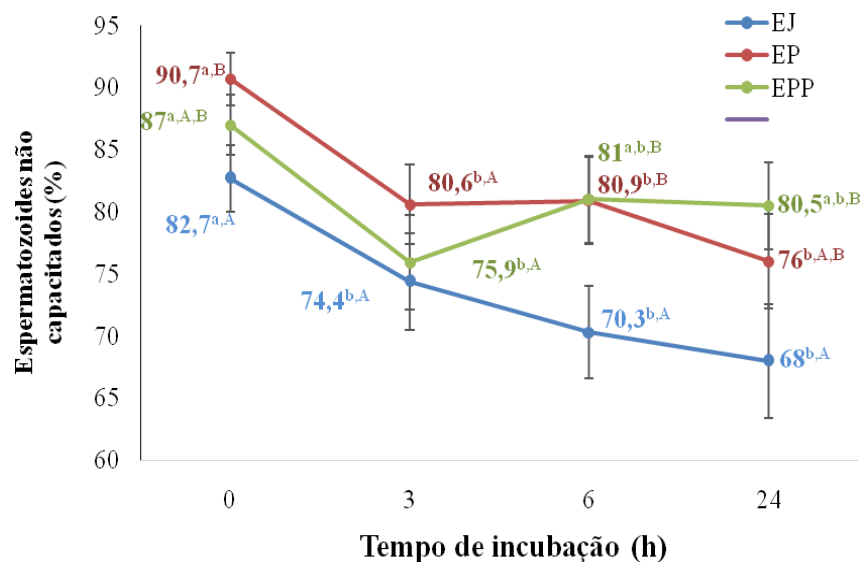


Figura 11 – Porcentagem de espermatozoides do ejaculado (EJ), do epidídimo (EP), do epidídimo + plasma seminal (EPP) não capacitados. Após o descongelamento e incubação nos períodos de 0 h, 30 min 6 h e 24 h de incubação. Média obtida a partir de uma réplica por touro (n=7). <sup>A,B</sup>Diferença significativa entre grupos a cada momento de incubação ( $P \leq 0,05$ ). <sup>a,b</sup>Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.3 Experimento 3. Avaliação da capacidade dos espermatozoides criopreservados do epidídimo de se ligarem as células da tuba uterina

Utilizando aproximadamente 90 agregados celulares por cada grupo/tempo, foi identificado que os espermatozoides do ejaculado (EJ), do epidídimo (EP) e do epidídimo incubados com plasma seminal (EPP) se comportaram da mesma forma em todos os tempos de incubação (Tabela 3). Sendo que em todos os grupos o número de espermatozoides ligados as CTU foi semelhante ( $P > 0,05$ ) nos vários momentos de avaliação. A análise dentro de cada grupo mostrou que ambos apresentaram queda gradativa no número de espermatozoides

ligados as CTU, sendo que o menor numero de espermatozoides ligados foi observado as 24 horas (Tabela 3).

Tabela 2. Número de espermatozoides ligados por mm de agregados de células da tuba uterina após co-incubação por 30 minutos, 6 horas e 24 horas.

Espermatozoide	Espermatozoides ligados (Media $\pm$ EP)		
	Tempo incubação		
	<u>30 minutos</u>	<u>6 horas</u>	<u>24 horas</u>
<b>EJ</b>	96,2 $\pm$ 26,3 <sup>a,A</sup>	45,4 $\pm$ 32,7 <sup>a,b,A</sup>	12,2 $\pm$ 4,9 <sup>b,A</sup>
<b>EP</b>	69,7 $\pm$ 26,3 <sup>a,A</sup>	82,5 $\pm$ 32,7 <sup>a,b,A</sup>	15,1 $\pm$ 4,9 <sup>b,A</sup>
<b>EPP</b>	90,6 $\pm$ 26,3 <sup>a,A</sup>	108,7 $\pm$ 32,7 <sup>a,A</sup>	18,1 $\pm$ 4,9 <sup>b,A</sup>

<sup>A,B</sup>Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre os três grupos de espermatozoides Ejaculado, Epidídimo e Epidídimo + Plasma, a 5% de probabilidade.

<sup>a,b,c</sup>Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem entre os grupos 30 minutos, 6 horas e 24 horas de incubação a 5% de probabilidade.

EJ espermatozoides do ejaculado;

EP espermatozoides do epidídimo;

EPP espermatozoides do epidídimo + plasma seminal.

Quando o teste de ligação foi realizado comparando espermatozoides do epidídimo criopreservados (EC) ou frescos (EF) os resultados mostraram que o grupo EF apresentou maior numero de células ligadas aos 30 minutos e às 24 horas de incubação do que o grupo EC (Tabela 4). Entretanto às 6 horas de incubação o número de espermatozoides ligados foi semelhante ( $P > 0,05$ ) em ambos os grupos (Tabela 4). Importante ressaltar que no grupo EF às 6 horas a quantidade de espermatozoides ligados foi inferior ao encontrado às 24 horas, enquanto no grupo EC essa diminuição foi constante durante todo o período (Tabela 4).

Tabela 3. Número de espermatozoides ligados por mm de agregados de células do oviduto após co-incubação por 30 minutos, 6h e 24 horas

Espermatozoide	Espermatozoides ligados (Media $\pm$ EP) Tempo incubação		
	30 minutos	6 horas	24 horas
<b>EP-F</b>	130,9 $\pm$ 21,2 <sup>a,A</sup>	47,3 $\pm$ 21,2 <sup>b,A</sup>	131,7 $\pm$ 21,2 <sup>a,A</sup>
<b>EP-C</b>	88,0 $\pm$ 21,2 <sup>a,A</sup>	54,4 $\pm$ 21,2 <sup>a,b,A</sup>	20,4 $\pm$ 21,2 <sup>b,B</sup>

<sup>A,B</sup>Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre os dois grupos de espermatozoide a 5% de probabilidade.

<sup>a,b,c</sup>Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem entre os grupos 30 minutos, 6 horas e 24 horas de incubação a 5% de probabilidade.

EP-F Espermatozoides do epidídimo frescos;

EP-C Espermatozoides do epidídimo criopreservados.

#### 4 DISCUSSÃO

A recuperação e criopreservação de espermatozoides do epidídimo de machos geneticamente valiosos, permite o armazenamento e uso futuro desse germoplasma para a disseminação de características desejáveis. No entanto, os resultados obtidos com o uso desses espermatozoides em biotécnicas reprodutivas são divergentes e inconstantes. Isso se deve, provavelmente, à falta de conhecimento sobre a fisiologia dessas células, tratando-as de forma similar às do ejaculado sem respeitar as diferenças fisiológicas entre elas. Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar a resistência de espermatozoides do epidídimo frente à criopreservação, bem como seu comportamento, longevidade e viabilidade após o descongelamento, comparando-o com os do ejaculado recuperados dos mesmos animais.

Inicialmente foram avaliadas as características físicas e morfológicas após o período de resfriamento e após a criopreservação. Os resultados mostraram que a qualidade dos espermatozoides do epidídimo no momento da coleta e após a criopreservação foi semelhante aos do ejaculado. Entretanto, quando a avaliação foi realizada após o resfriamento houve uma perda na qualidade espermática das amostras do ejaculado, que apresentaram menor padrão de motilidade, maior porcentagem de células com membrana plasmática danificada e com acrossoma reagido. Já nos espermatozoides do epidídimo a queda na qualidade, determinada

pelos vários parâmetros avaliados, só foi observada após a criopreservação e não após a refrigeração. Esse comportamento observado para os dois tipos celulares foi constante para todos as avaliações e, sugerem que os espermatozoides do epidídimo são mais resistentes à refrigeração dos que os do ejaculado, apesar do efeito da criopreservação ter sido semelhantes. Resultados similares foram relatados por Monteiro et al., 2013, que observaram que espermatozoides do epidídimo de equinos são mais resistentes à refrigeração quando comparados aos espermatozoides do ejaculado.

A refrigeração é a primeira etapa da criopreservação, e refere-se a passagem da temperatura ambiente para a de 5°C. Esta é uma faixa crítica devido à ocorrência da fase de transição dos fosfolipídios da membrana plasmática do estado líquido-cristalino para o estado de gel (Revisado por MONTEIRO et al., 2013). Nesta fase de transição, a redução da temperatura altera a orientação dos lipídios de forma que as cadeias de ácidos graxos ordenam-se paralelamente tornando o ambiente intracelular uma estrutura rígida, repleta de áreas fracas e susceptíveis a rupturas (HAMMERSTED et al., 1990). Os resultados desses estudos sugerem que a fase de transição pode ocorrer de forma diferente nos espermatozoides do epidídimo e ejaculado, tornando-os diferentes quanto à resistência ao frio.

A sensibilidade ao choque térmico varia de acordo com o grau de maturação dos espermatozoides, com a espécie e com a qualidade e quantidade do plasma seminal, podendo ser determinada pelo conteúdo de colesterol na membrana e o grau de saturação dos ácidos graxos (WATSON, 1981).

A maior diferença entre os espermatozoides do epidídimo e do ejaculado é a exposição ao plasma seminal. Vários estudos (THÉRIEN et al., 1998; MANJUNAH et al., 2007), tem mostrado que no momento da ejaculação proteínas da família *binder sperm proteins*, (BSP) presentes no plasma seminal se aderem à membrana plasmática e sequestram o colesterol, mudando a composição da membrana e tornando o espermatozoide mais sensível ao frio. Portanto, o fato dos espermatozoides do epidídimo não terem proteínas BSP ligadas à membrana, e conseqüentemente, terem maior quantidade de colesterol pode ser um dos fatores responsáveis pela maior resistência desses espermatozoides ao frio. Apesar de mais resistente ao frio os espermatozoides do epidídimo apresentaram características similares aos do ejaculado após a criopreservação. Entretanto, deve-se considerar que a congelação promove outras lesões celulares além do choque térmico, como a formação de cristais de gelo intracelulares, injúrias oxidativas, estresse osmótico, entre outras (HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 2000). Os espermatozoides da cauda do epidídimo mesmo que mais

resistentes à refrigeração, também sofreram com os efeitos da congelação. Essa hipótese pode ser confirmada pelos resultados deste estudo, em que espermatozoides criopreservados tanto do ejaculado como epidídimo apresentaram maior lesão de membrana, de acrossoma, número de anormalidade, e perda nos padrões de motilidade.

Além dos padrões apresentados no momento do descongelamento, o tempo que os espermatozoides permanecem viáveis é fator fundamental para o sucesso no uso de espermatozoides criopreservados em biotécnicas reprodutivas. Portanto, com o intuito de avaliar o tempo de sobrevivência pós-descongelamento assim como as alterações ao longo do tempo, amostras de espermatozoides do EP e EJ foram incubadas por até 24 horas e avaliadas durante o período de incubação.

Considerando que o plasma seminal tem papel importante na capacitação e na prevenção da reação acrossomal (LEE et al., 1987; BURDEN et al., 2006), foi proposto neste experimento avaliar se a exposição dos EP ao plasma seminal, após o descongelamento, influenciaria de alguma forma a cinética espermática pós-descongelamento, igualando o comportamento dos EP ao EJ. Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o grupo EP, com ou sem plasma seminal, apresentaram mais células com membrana íntegra, com acrossoma íntegro e não capacitadas às 6 horas de incubação do que os espermatozoides do grupo EJ. Portanto, no mesmo período de tempo após o descongelamento os espermatozoides do ejaculado foram mais afetados, sendo os do epidídimo mais estáveis. Pode-se observar também uma concordância entre a porcentagem de células com acrossoma reagido, e capacitadas. Sendo a reação acrossomal um dos eventos relacionados à capacitação, tais resultados se completam, além de corroborarem com o que foi observado por Cummins (1976) e Stout (2012). Esses autores observaram que os EP apresentam sinais de capacitação apenas após 6 horas de incubação.

A maior estabilidade do EP pode ser devido a diferenças no conteúdo de colesterol da membrana dos EP e EJ. Como já mencionado, os espermatozoides do ejaculado possuem menor conteúdo de colesterol e tal fato contribui para a ocorrência de reações acrossômicas prematuras e conseqüentemente diminuição da viabilidade pós-descongelamento. Isso porque com o movimento/retirada do colesterol, ocorre um decréscimo na permeabilidade aos cátions, como é o caso do cálcio, que sabidamente está envolvido no desencadeamento da capacitação espermática. Com essa característica é muito provável que os EP demorem mais tempo para sofrer a reação acrossômica. Por outro lado, a adição do plasma seminal deveria ter tornado o EP mais próximo do EJ, mas ao contrário do esperado, a adição do plasma seminal não

demonstrou quaisquer efeitos benéficos ou deletérios ao grupo EP. É possível que o processo de criopreservação tanto do PS como dos espermatozoides do epidídimo, possa ter causado alguma alteração que impediu proteínas do PS de interagir com a membrana e desencadear as alterações semelhantes ao que ocorre nos espermatozoides do ejaculado. Outros autores também não encontraram efeito da incubação com PS em parâmetros de qualidade espermática (MORTIMER et al., 1998; RICKARD et al., 2014).

Outro evento crucial para o processo de fecundação *in vivo* é a formação do reservatório da tuba uterina, pois garante a disponibilidade de espermatozoides viáveis, aptos a fecundar um ovócito no momento da ovulação (GUALTIERI et al., 2010). Além disso, a interação do espermatozoide com moléculas presentes na região apical das células que revestem a luz do istmo regula a capacitação espermática, mantendo a viabilidade das células (HUNTER & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2004). Sabe-se que os espermatozoides do epidídimo ainda não entraram em contato com o plasma seminal e, portanto, não possuem as moléculas responsáveis pela ligação as células da tuba uterina. Baseado nesse conhecimento levantou-se a hipótese de que a adição do PS aos espermatozoides do epidídimo seria capaz de reverter essa situação e proporcionar mudanças que viabilizassem a sua ligação às células do oviduto. Portanto foram realizados testes de ligação dos EP e EPP nas CTU após a criopreservação.

Para uma avaliação mais completa o teste foi realizado com maior número de agregados e após vários momentos de incubação, diferindo do protocolo utilizado por outros autores (DE PAUW et al., 2002; GWATHMEY et al., 2006; KARDIVEL et al., 2012; CARVALHO, 2013). Surpreendentemente, os resultados mostraram que os espermatozoides do epidídimo, com ou sem plasma seminal foram capazes de se ligar, *in vitro* às CTU da mesma maneira que os do ejaculado. Para todos os grupos houve uma queda gradativa no número de espermatozoides ligados as CTUs, durante todo o período de incubação. Entretanto, após 24 cerca de 15 espermatozoides ainda permaneciam ligados às células. Estes resultados discordam dos apresentados por (GWATHMEY et al., 2006) que concluiu que a presença das proteínas PDC-109, BSP-A3, e BSP-30-kDa, produzidas pelas vesículas seminais, seriam cruciais para a fecundação e manutenção da motilidade espermática, no trato reprodutivo da fêmea.

Diante dos resultados obtidos foi levantada a hipótese de que a ligação dos EP às CTU poderia ser um efeito da criopreservação. Essa hipótese foi baseada no estudo de Ardon & Suarez (2013) que demonstraram que a criopreservação altera a superfície da membrana plasmática dos espermatozoides, alterando assim as proteínas que a compõe. Para testar essa

hipótese foi realizado mais um teste de ligação utilizando espermatozoides do epidídimo frescos e criopreservados. Os resultados obtidos demonstraram que a criopreservação influenciou a ligação dos espermatozoides, mas não por induzirem a ligação às CTU, mas por afetarem essa ligação. Isso porque a quantidade de espermatozoides ligados foi superior nos espermatozoides do epidídimo frescos comparado com os criopreservados. É importante salientar que a ligação dos espermatozoides frescos às CTU persistiu até as 24 horas com número similar de espermatozoides ligados.

Proteínas conhecidas como anexinas, presentes no sistema endocanabióide mais açúcares localizados na região apical das células da tuba uterina formam sítios de ligação com as proteínas BSP's, presentes na membrana plasmática de espermatozoides do ejaculado, formando os reservatórios da tuba uterina de bovinos (IGNOTZ et al., 2007). Espermatozoides do epidídimo não entraram em contato com o plasma seminal, consequentemente a ausência das BSP's seria um fator crucial para que estes espermatozoides fossem incapazes de completar o processo de capacitação e formação do reservatório, assim como os espermatozoides do ejaculado. Tais afirmações, descritas até o momento, são completamente contraditórias. Uma vez que os espermatozoides do epidídimo estudados se capacitaram, mesmo que em tempos diferentes e se ligaram da mesma forma às CTU. É possível que outras proteínas, além das já citadas, e que façam parte da composição da membrana do espermatozoide do epidídimo sejam também capazes de promover a ligação nas células da tuba uterina formando o reservatório no istmo. Se esse for o caso, essas proteínas podem ser de alguma forma ser afetadas pela criopreservação, o que induzia ao menor número de espermatozoides ligados as CTU como o observado neste estudo para os espermatozoides do epidídimo criopreservados. De fato em suínos já foi demonstrado que algumas proteínas parecem ser capazes de se ligar nas células da tuba uterina de porcas (KADIRVEL et al., 2012).

Sumarizando, os espermatozoides do EJ iniciaram gradualmente o processo de capacitação, enquanto os espermatozoides do epidídimo começam a demonstrar indícios de capacitação após as 6 horas de incubação. Estes dados podem ser correlacionados com a maior quantidade de espermatozoides ligados às CTU nos grupos EP e EPP às 6 horas de incubação, bem como com os resultados obtidos da cinética pós descongelamento em que às 6 horas de incubação os EP e EPP são semelhantes, apresentando maior número de espermatozoides não capacitados que os EJ. Além disso, o presente estudo demonstrou que ao

contrário do descrito até o momento, outros fatores/moléculas estão envolvidos na formação do reservatório da tuba uterina.



## 5 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que espermatozoides do epidídimo podem ser criopreservados da mesma forma que espermatozoides do ejaculado, sendo mais resistentes à refrigeração. Após o descongelamento, os espermatozoides do epidídimo demonstraram características de capacitação tardia, apresentando melhor qualidade por mais tempo. Os espermatozoides do epidídimo possuem a mesma capacidade de ligação às CTU que os espermatozoides do ejaculado, com a presença do plasma seminal ou não, apresentando queda gradativa no número de espermatozoides ligados durante o período de 24 horas. No entanto, foi observado que a criopreservação afetou negativamente a capacidade de ligação dos espermatozoides do epidídimo e do ejaculado às CTU.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDON, F. & SUAREZ, S.S. Cryopreservation increases coating of bull sperm by seminal plasma binder of sperm proteins BSP1, BSP3 and BSP5. **Reproduction Research**, v.146, p.111-117, 2013.

BERTOL, M.A.F. **Viabilidade de espermatozóides bovinos colhidos de epidídimos mantidos em temperatura ambiente de 18-20° C**.Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2012. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia Universidade Federal do Paraná, 2012.

BURDEN, H.P.; HOLMES, C.H.; PERSAD, R.; WHITTINGTON, K. Prostatomes – their effects on human male reproduction and fertility. **Human Reproduction**, v. 12, p.283-292, 2006

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; LEMES, A.P.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. et al. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p.1346–1351, 2009.

CARVALHO, J.O. **Aspectos moleculares, estruturais e funcionais de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2013. 98p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluometric assessment of plasma, acrossomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

CORMIER, N.; SIRAD, M.A.; BAILEY, J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 461-468, 1997.

CUMMINS, J.M. Effects of epididymal occlusion on sperm maturation in the hamster. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 197, p.183-190, 1976.

- DE PAUW, I.M.C.; SOOM, A.V.; LAEVENS, H.; VERBERCKMOES, S.; KRUIF, A. Sperm Binding to Epithelial Oviduct Explants in Bulls with Different Nonreturn Rates Investigated with a New *In Vitro* Model. **Biology of Reproduction**, v. 67, p.1073–1079, 2002.
- GUALTIERI, R.; MOLLO, V.; BARBATO, V.; TALEVI, R. Ability of sulfated glycoconjugates and disulfide-reductants to release bovine epididymal sperm bound to the oviductal epithelium *in vitro*. **Theriogenology**, v. 73, p.1037–1043, 2010.
- GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; MUELLER, J.L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S.S. Bovine Seminal Plasma Proteins PDC-109 , BSP-A3, and BSP-30-kDa Share Functional Roles in Storing Sperm in the Oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 75, p.501–507, 2006.
- HAMMERSTEDT, H. R.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, P.N. Cryopreservation of Mammalian Sperm : What We Ask Them to Survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p.73-88, 1990.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p.343-352, 1990.
- HUNTER, R.H.F. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Capacitation of mammalian spermatozoa *in vivo*, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, p.243–50, 2004.
- IGNOTZ, G.G.; CHO, M.Y.; SUAREZ, S.S. Annexins Are Candidate Oviductal Receptors for Bovine Sperm Surface Proteins and Thus May Serve to Hold Bovine Sperm in the Oviductal Reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 77, p.906–913, 2007.
- JUYENA, N.S. & STELLETTA, C. Seminal Plasma : An Essential Attribute to Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, p.536–551, 2012.
- KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v. 60, p.1249–1259, 2003.
- KADIRVEL, G.; MACHADO, S.A.; KORNELI, C.; COLLINS, E.; MILLER, P.; BESS, K.N.; AOKI, K.; TIEMEYER, M.; BOVIN, N.; MILLER, D.J. Porcine Sperm Bind to Specific 6-Sialylated Biantennary Glycans to Form the Oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 87, p.1–11, 2012.
- KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 63-67, 2007.
- LEE, M. A.; TRUCCO, G.S.; BECHTOL, K.B.; WUMMER, N.; KOPF, G.S.; BLASCO, L.; STOREY, B.T. Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by chlortetracycline fluorescence, **Fertility and Sterility** v. 48, p.649–658, 1987.
- MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**. v. 65, p.217-228, 2007;

MARTINEZ-PASTOR, F.; GUERRA, C.; KAABI, M. DIAZ, A.R.; ANEL, E.; HERRAEZ, P.; PAZ, P. ANEL, L. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. **Theriogenology**, v. 63, p.24–40, 2005.

MARTINEZ-PASTOR, F.; MACIAS, V.G.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymidis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v. 65, p. 471-485, 2006.

MARTINS, C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 326–331, 2007.

MARTINS, C.F.; DRIESSEN, K.; COSTA, M.P.; CARVALHO, J.O.; SOUSA, R.V.; RUMPF, R.; DODE, M.N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5°C by different periods of time. **Animal Reproduction Science**, v. 116, p.50–57, 2009.

MONTEIRO, G.A.; GUASTI, P.N.; HARTWIG, F.P.; DELLAQUA JR.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Cooling of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p.681- 686, 2013.

MORTIMER, S.T.; SWAN, M.A.; MORTIMER, D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 13, p.2139-2146, 1998.

MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of Proteins in the Accessory Sex Gland Fluid Associated With Fertility Indexes of Dairy Bulls: A Proteomic Approach. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 201-211, 2006.

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

RICKARD, J.P.; PINI, T.; SOLEILHAVOUP, C.; COGNIE, J.; BATHGATE, R.; LYNCH, G.W.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.; DRUART, X.; DE GRAAF, S.P. Seminal plasma aids the survival and cervical transit of epididymal ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 148, p.469-478, 2014.

STOUT, M.A. **Comparison of epididymal and ejaculated sperm collected from the same holstein bulls**. Louisiana: Faculty of the Louisiana State University and agricultural and Mechanical Collage, 2012. 203p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) Agricultural and Mechanical Collage, 2012.

THÉRIEN, I.; MOUREAU, R.; MANJUNATH, P. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma and High-Density Lipoprotein induce Cholesterol Efflux from epididymal Sperm. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 768-776, 1998.

WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p.483-92, 1981.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p.481–492, 2000.

## ANEXOS

### **Anexo A. Solução do teste de capacitação pela Clortetraciclina (CTC)**

B1. Solução de 1,4-Diazabicyclo [2.2.2.] Octane, DABCO: 0,22M

- PBS pH 7,4 .....10mL
- DABCO (Sigma-D2522).....0,247g

Obs: aliquotar em volumes de 60 $\mu$ L e conservar a -20°C

B2. Solução de glutaraldeído (50%) em TRIS (2,5M)

- TRIZMA BASE .....0,302g
- Água Mili Q .....1000 $\mu$ L
- Solução de Glutaraldeído 5 .....1000 $\mu$ L

Obs: preparar diariamente

B3. Solução estoque de TRIS-NaCl: 20mM/130nM; pH 7,8

- TRIZMA BASE .....1,21g
- NaCl .....3,8g
- Água Mili Q .....500mL

Obs: aliquotar em volumes de 10mL e conservar a -20 °C

B.4 Solução de trabalho CTC

- Solução estoque de TRIS-NaCl .....10mL
- CTC .....0,0038g
- L-Cisteína .....0,0088g

Obs: preparar diariamente e estocar a 4 °C, protegido da luz.

## ANEXO B. Solução para avaliação da integridade de membrana plasmática

### B.1 Solução estoque de IP (0,75nM) – Solução I

- IP ..... 10 mg
- Solução salina 0,9% ..... 20 mL

Obs: alíquotar em volumes de 10 µL e conservar a -20 °C protegido da luz

### B.2 Solução estoque de C-FDA – Solução II

- C-FDA ..... 9,2 mg
- DMSO ..... 20 mL

### B.3 Solução estoque de formaldeído – Solução III

- Formaldeído 40% ..... 4 mL
- Solução Salina 0,9% ..... 96 mL

### B.3 Solução estoque de citrato de sódio 3% - Solução IV

- Citrato de sódio ..... 3 g
- Solução salina 0,9% ..... 100 mL

### B.4 Solução de trabalho de C-FDA

- Solução I ..... 2 %
- Solução II ..... 1 %
- Solução III ..... 1 %
- Solução IV ..... 96 %

Obs: preparar diariamente e estocar a 4 °C, protegido da luz.

## **ANEXO C. Solução para avaliação da integridade acrossomal**

### **C.1 Solução estoque de IP (0,75 mM) – Solução I**

- IP ..... 10 mg
- Solução salina 0,9% ..... 20 mL

Obs: aliquotar em volumes de 10  $\mu$ L e conservar a -20 °C protegido da luz

### **C.2 Solução estoque de PNA – Solução II**

- PNA ..... 1 mg
- Tampão fosfato (PBS) ..... 1 mL

Obs: aliquotar em volumes de 10  $\mu$ L e conservar a -20 °C protegido da luz

### **C.3 Solução estoque de formaldeído – Solução III**

- Formaldeído ..... 4 mL
- Solução salina 0,9% ..... 96 mL

### **C.4 Solução estoque de citrato de sódio 3% - Solução IV**

- Citrato de sódio .....3 g
- Solução salina 0,9 % ..... 100 mL

### **C5. Solução de trabalho de PNA**

- Solução I .....2 %
- Solução II ..... 1 %
- Solução III ..... 1%
- Solução IV ..... 96 %

Obs: preparar diariamente e estocar a 4 °C, protegido da luz.