

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA ADIÇÃO DE COLESTEROL SOBRE A
VIABILIDADE E FERTILIDADE DE ESPERMATOZOIDES
EQUINOS REFRIGERADOS

FELIPE PIRES HARTWIG

BOTUCATU-SP
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA ADIÇÃO DE COLESTEROL SOBRE A
VIABILIDADE E FERTILIDADE DE ESPERMATOZOIDES
EQUINOS REFRIGERADOS

FELIPE PIRES HARTWIG

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária (Área de concentração: Reprodução Animal) para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. José Antônio Dell`Aqua Junior

BOTUCATU-SP

2013

NOME DO AUTOR: Felipe Pires Hartwig

TÍTULO: Efeito da adição de colesterol sobre a viabilidade e fertilidade de espermatozoides equinos refrigerados

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. José Antônio Dell`Aqua Junior (Presidente e Orientador)

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa (Membro)

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. André Maciel Crespilho (Membro)

Departamento de Reprodução Animal
FMVA - UNISA – Santa Amaro

DATA DA DEFESA: 22 de julho de 2013

***Dedico este trabalho à minha família
pela educação fornecida e apoio
fundamental para a conclusão desta
etapa da minha vida.***

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Botucatu pela oportunidade de cursar o Mestrado.

À FAPESP pela bolsa de estudo e auxílio financeiro concedido para realização do projeto de pesquisa.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas – UFPel, incluindo docentes e colegas da graduação pela minha formação profissional e pessoal.

À toda minha família, em especial ao meu irmão Fernando pela amizade e ajuda constante e a minha namorada Êmille pelo incentivo, compreensão e apoio nas minhas decisões.

Aos meus colegas de pós-graduação pela amizade, paciência, momentos de descontração e trabalho em equipe durante este período. Ao Nando pela amizade, companheirismo e ajuda durante o experimento. Ao Gabriel pela amizade e troca de ideias antes e durante o projeto de pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Junior, pela amizade, ensinamentos e principalmente por ter confiado em minha capacidade e ideias propostas.

Ao Professor Titular Frederico Ozanam Papa, pela amizade e ensinamentos indispensáveis, tanto acadêmicos como de conduta de profissionalismo extremo durante este período.

Ao Professor Marco Antônio Alvarenga, pela amizade, ensinamentos e oportunidades disponibilizadas neste período.

Aos Professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelos conhecimentos fornecidos.

Aos Funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, pelo auxílio e convivência neste período.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL: microlitro

μm/s: micrômetro por segundo

°C: graus Celsius

A23187: cálcio ionóforo

ACR: taxa de reação acrossômica

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

BC: *bad cooler*

CASA: análise computadorizada de movimento espermático

CLC: colesterol ligado a ciclodextrina

FITC-PSA: fluoroisothiocinato conjugado a *psium sativun*

GC: *good cooler*

h: hora

HTMO: Hamilton Thorne Research

IA: inseminação artificial

IMP: integridade de membrana plasmática

LPC: lisofosfaditilcolina

mg: miligrama

mL: mililitro

MP: motilidade progressiva

MT: motilidade total

PC 12: dilauroilfosfatidilcolina

RAP: espermatozoides rápidos

VAP: velocidade de trajeto

VCL: velocidade curvilínea

VSL: velocidade linear progressiva

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Metodologia da análise computadorizada (CASA) da cinética espermática de equinos.....	26
Tabela 2 -	Valores médios e erro padrão para MT, MP, VAP, VCL, VSL e RAP de espermatozoides refrigerados a 5° C nos momentos T0, T24 e T48 de amostras suplementadas ou não com CLC.....	33
Tabela 3 -	Valores médios (%) e erro padrão para integridade de membrana plasmática de espermatozoides refrigerados a 5° C nos momentos T0, T24 e T48 de amostras suplementadas ou não com CLC.....	33
Tabela 4 -	Valores médios (%) e erro padrão para MT, MP, RAP e IMP de espermatozoides refrigerados a 5° C e 15° C nos momentos T0 e T24 de amostras suplementadas ou não com CLC.....	34
Tabela 5 -	Valores médios e erro padrão para MT, MP, VAP, VCL, VSL e RAP de espermatozoides de garanhões <i>bad cooler</i> refrigerados a 5° C nos momentos T0, T24 e T48 de amostras suplementadas ou não com CLC.....	34
Tabela 6 -	Valores médios e erro padrão para MT, MP, VAP, VCL, VSL e RAP de espermatozoides de garanhões <i>good cooler</i> refrigerados a 5° C nos momentos T0, T24 e T48 de amostras suplementadas ou não com CLC.....	35

Tabela 7 -	Valores médios (%) e erro padrão para integridade de membrana plasmática de amostras suplementadas ou não com CLC de espermatozoides de garanhões <i>good cooler</i> e <i>bad cooler</i> refrigerados a 5° C nos momentos T0, T24 e T48.....	35
Tabela 8 -	Média e erro padrão (%) para reação acrossômica (ACR) de espermatozoides equinos frescos e refrigerados a 5° C por 24 horas antes (Pré - Ca) e após 1 (Ca - 1h), 2 (Ca - 2h), e 3 horas (Ca - 3h) de incubação com cálcio ionóforo a 37° C.....	36
Tabela 9 -	Taxa de concepção por ciclo (%) do sêmen refrigerado por 24 horas a 5° C de garanhão <i>good cooler</i> e <i>bad cooler</i> suplementado ou não com CLC.....	36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação sequencial dos eventos de interação entre o espermatozoide e oócito que antecedem a fertilização. Fonte: Gadella et al. (2001). Ligação do espermatozoide à zona pelúcida (a) e reação acrossômica (b). Penetração através da zona pelúcida ao espaço perivitelínico (c). Ligação e fusão do espermatozoide ao oolema (d). Secreção de grânulos corticais com bloqueio à polispermia (e).....**9**

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

Introdução.....	1
Hipótese.....	3
Objetivos.....	3

CAPÍTULO 2

Revisão de Literatura.....	4
1. Princípios da criopreservação.....	4
2. Atuação do colesterol na preservação celular.....	5
3. Utilização de ciclodextrinas.....	6
4. Capacitação espermática e reação acrossômica.....	8
5. Incorporação de colesterol à membrana espermática.....	10

CAPÍTULO 3 – Trabalho Científico

Utilização de colesterol ligado a ciclodextrina: uma alternativa para gananhões <i>bad cooler</i>	20
---	----

CAPÍTULO 4

Conclusões Gerais.....	45
------------------------	----

ANEXOS

RESUMO

HARTWIG, F. P. **Efeito da adição de colesterol sobre a viabilidade e fertilidade de espermatozoides equinos refrigerados.** Botucatu. 2013 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A inseminação artificial com sêmen refrigerado é uma biotecnia imprescindível para os programas reprodutivos de equinos. Entretanto, durante a refrigeração o espermatozoide pode sofrer danos irreversíveis que irão prejudicar os índices de fertilidade. A incorporação de colesterol ligado a ciclodextrina (CLC) é uma estratégia de aumentar a resistência espermática em baixas temperaturas. No entanto, estudos anteriores tem sugerido que o colesterol presente em altos níveis na membrana plasmática pode interferir no processo de capacitação e consequentemente de fertilização. Para isso, foi realizado um trabalho dividido em cinco experimentos. No experimento 1 o objetivo foi determinar a concentração mais adequada de CLC para a utilização na refrigeração de espermatozoides equinos. No experimento 2 o objetivo foi comparar as temperaturas de 15° C e 5° C para refrigeração de espermatozoides equinos tratados com CLC. No experimento 3 o objetivo foi verificar a influência da adição de CLC sobre a qualidade do sêmen refrigerado de garanhões *bad cooler* e *good cooler*. No experimento 4 o objetivo foi avaliar a influência da adição de CLC sobre a ocorrência de reação acrossomal. O objetivo do experimento 5 foi avaliar a fertilidade de espermatozoides refrigerados de garanhões *bad cooler* (BC) e *good cooler* (GC) tratados com CLC. No experimento 1 foram utilizados dois ejaculados de 24 garanhões. Após a diluição com Botu-Sêmen® na concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL, cada ejaculado foi dividido em quatro grupos: controle (C) e tratado com 1 mg (CLC-1), 1,5 mg (CLC-1,5) e 2 mg (CLC-2) de CLC/120 x 10^6 de espermatozoides e refrigerado por 48 horas a 5° C. Para o experimento 2 foram utilizados dois ejaculados de 12 garanhões. Cada ejaculado foi diluído conforme o experimento 1, dividido em quatro grupos: C e CLC-1,5 refrigerados a 15° C e a 5° C por 24 horas. Para o experimento 3 foram utilizados 9 garanhões GC e de 9 garanhões BC, sendo dois ejaculados de cada um. Os ejaculados foram fracionados como nos experimentos anteriores e divididos em dois grupos: C e CLC-1,5 refrigerados a 5° C por 48 horas. Nos experimentos 1, 2, 3 a cinética espermática foi avaliada por análise computadorizada do movimento espermático e a integridade de membrana plasmática (IMP) por microscopia de epifluorescência. As avaliações dos experimentos 1 e 3 foram realizadas antes da refrigeração (T0), 24 (T24)

e 48 horas (T48) após. No experimento 2 as avaliações foram feitas apenas nos momentos T0 e T24. No experimento 4, foram utilizados dois ejaculados de 5 garanhões e após diluído como já descrito, cada ejaculado foi dividido em quatro alíquotas de 5 mL nos grupos: C e CLC-1,5 mantidos à fresco ou refrigerados por 24 horas a 5° C. Para indução da capacitação, as alíquotas foram incubadas com cálcio ionóforo a 37° C por 3 horas. As análises de reação acrossomal (ACR) foram efetuadas por citometria de fluxo antes da incubação e após 1 hora, 2 horas e 3 horas de incubação. Para o experimento 5 foram utilizadas 35 éguas, sendo 2 ciclos de 10 para um garanhão GC e 2 ciclos de 25 para um garanhão BC. Após 24 horas da indução da ovulação as inseminações foram realizadas com os grupos C e CLC-1,5 refrigerados a 5° C por 24 horas. De acordo com os resultados do experimento 1, todos os grupos tratados com CLC apresentaram maior IMP sobre C e os grupos CLC-1,5 e CLC-2 apresentaram os melhores valores de cinética espermática. No experimento 2, a temperatura de refrigeração de 5° C foi superior a 15° C quando os espermatozoides foram tratados com CLC. No experimento 3 os garanhões GC e BC foram beneficiados com o tratamento de CLC-1,5 entretanto, os BC foram os mais favorecidos visto que além da cinética espermática obtiveram também um incremento na IMP. No experimento 4, houve um atraso na capacitação de pelo menos 3 horas nos espermatozoides frescos e de pelo menos 1 hora nos refrigerados após a adição de CLC-1,5. No experimento 5, com a adição de CLC-1,5 a fertilidade do garanhão BC foi aumentada significativamente, no entanto, a do GC não sofreu alteração. Portanto, pode-se concluir que a incorporação de CLC é uma estratégia eficiente para a refrigeração de sêmen equino, sendo indicada para garanhões BC.

Palavras chave: sêmen equino, refrigeração, colesterol, fertilidade.

ABSTRACT

HARTWIG, F. P. **Effect of cholesterol addition on the viability and fertility of equine cooled spermatozoa.** Botucatu. 2013 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Artificial insemination with cooled semen is an invaluable biotechnique for equine reproductive programs. However, the cooling process may cause irreversible damage to spermatozoa, thus reducing fertility rates. The incorporation of cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) to the plasmatic membrane is an strategy to increase sperm resistance to low temperatures. However, previous studies have suggested that high levels of cholesterol may interfere with capacitation process and, consequently, with fertilization. To this end, a study was performed in five experiments. In experiment 1, the aim was to determine the best CLC concentration for the purpose of cooling equine spermatozoa. In experiment 2, the aim was to compare the temperatures of 15 °C and 5 °C for cooling equine semen treated with CLC. In experiment 3, the aim was to assess the influence of CLC addition for cooled semen quality of bad cooler (BC) and good cooler (GC) stallions. In experiment 4, the aim was to evaluate the influence of CLC addition for the occurrence of acrosome reaction. The aim of experiment 5 was to evaluate the fertility of cooled CCL-treated semen from BC and GC stallions. In experiment 1, two ejaculates from 24 stallions were used. After dilution with Botu-Sêmen[®] to a concentration of 50×10^6 cells/mL, each ejaculate was divided into four groups: control (C) and treated with 1 mg (CLC-1), 1.5 mg (CLC-1.5) and 2 mg (CLC-2) of CLC/ 120×10^6 cells, and cooled for 48 hours at 5 °C. For experiment 2, two ejaculates from 12 stallions were used. Each ejaculated, after dilution according to experiment 1, was divided into 4 groups: C and CLC-1.5 cooled at 15 °C and 5 °C for 24 hours. For experiment 3, two ejaculates from nine GC and nine BC stallions were used. The ejaculates were diluted according to the previous experiments and divided into two groups: C and CLC-1.5 cooled at 5 °C for 48 hours. In experiments 1, 2 and 3, sperm kinetics was evaluated by computerized analysis of spermatoc movement, and plasmatic membrane integrity (IMP) was evaluated by epifluorescence microscopy. The assessments of experiments 1 and 3 were performed before cooling (T0), 24 (T24) and 48 hours (T48) after. In experiment 2, the assessments were performed only at moments T0 and T24. In experiment 4, two ejaculates from 5 stallions were used. After dilution as described for the other experiments, each ejaculate

was divided into four 5 mL aliquots into C and CLC-1.5 groups, kept fresh or cooled for 24 hours at 5 °C. To induce capacitation, the aliquots were incubated with calcium ionophore at 37 °C for 3 hours. Acrosome reaction (ACR) analyses were performed by flow cytometer before incubation and at 1 hour, 2 hours and 3 hours of incubation. For experiment 5, 35 mares were used, with 2 cycles of 10 to a GC stallion and 2 cycles of 25 to a BC stallion. After 24 hours of ovulation induction, inseminations were performed using C and CLC-1.5 groups cooled at 5 °C for 24 hours. According to experiment 1 results, all CLC-treated groups presented greater IMP compared to the respective C group, and the groups CLC-1.5 and CLC-2 presented the best results for sperm kinetics. In experiment 2, the cooling temperature of 5 °C was superior to 15 °C for CLC-treated sperm. In experiment 3, both GC and BC stallions were benefited by CLC-1.5 treatment, but BC stallions were greater favored since, in addition to sperm kinetics, there was also an increase in IMP. In experiment 4, there was a delay of capacitation at least 3 hours in fresh spermatozoa and of at least 1 hour in cooled spermatozoa after the addition of CLC-1.5. In experiment 5, the addition of CLC-1.5 significantly improved the BC stallion fertility, but no differences were observed for the GC stallion. Therefore, it is possible to conclude that CLC incorporation is an efficient strategy for equine semen cooling, although it is mainly indicated for BC stallions.

Keywords: equine semen, cooling, cholesterol, fertility.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

O avanço da reprodução assistida nas espécies domésticas vem sendo alcançado por meio da aplicação de biotecnias cada vez mais modernas. O desenvolvimento de técnicas adequadas para o processamento, preservação e armazenamento de sêmen corresponde a uma das etapas mais importantes nesse avanço, visto os diversos benefícios que a inseminação artificial (IA) proporciona para os atuais programas reprodutivos.

Por meio do uso da IA com sêmen criopreservado é possível a utilização do reprodutor em momentos nos quais não seria possível a monta natural ou a utilização do sêmen fresco. É o caso de animais que se encontram em campanhas esportivas, situações de comprometimento físico ou mesmo de óbito. Esta biotecnica possibilita ainda o transporte de sêmen a longas distâncias e um melhor aproveitamento de garanhões geneticamente superiores (PIMENTEL e CARNEIRO, 2008).

Após a aprovação da IA pela maioria das associações das raças de equinos, a utilização da técnica foi amplamente difundida entre os criatórios desta espécie (AURICH e AURICH, 2006). No entanto, apesar dos benefícios, existem fatores limitantes para o uso da IA com sêmen criopreservado e que contribuem para a ocorrência de variações nos resultados de fertilidade (AURICH, 2008; LOOMIS e GRAHAM, 2008).

A espécie equina apresenta os maiores índices de variabilidade de qualidade seminal entre as espécies domésticas. Um dos motivos para ocorrência deste fato é devido aos critérios de seleção dos reprodutores, os quais levam em consideração principalmente a genealogia e o desempenho atlético, deixando em segundo plano os parâmetros de fertilidade (VARNER et al., 2010). Com isto, é propiciada a ocorrência de variabilidade entre garanhões em relação à resistência espermática frente aos processos da criopreservação (BRINSKO et al., 2000). Alguns animais apresentam tamanha sensibilidade a baixas temperaturas, que somente é possível utilizar o sêmen no estado fresco, situação na qual são reduzidos os benefícios gerados pela IA para um considerável número de reprodutores (AURICH, 2008).

As espécies que apresentam espermatozoides com alta relação molar de colesterol:fosfolipídio de membrana possuem maior resistência frente aos processos de criopreservação (DARIN-BENNETT e WHITE, 1977). Através desta informação, estudos têm sido desenvolvidos em diferentes espécies para avaliar o efeito da adição do

colesterol ligado à ciclodextrina (CLC) à membrana espermática frente aos processos envolvidos na criopreservação (COMBES et al., 2000; PURDY e GRAHAM, 2004).

Os resultados obtidos *in vitro* em equinos com a adição de (CLC) são muito promissores, no entanto, até o momento as taxas de concepção por ciclo utilizando sêmen congelado não ultrapassaram 25% (ZAHN et al., 2002; SPIZZIRI et al., 2010), valor muito inferior em comparação a média de 53% descrita por Loomis (2001). Por esta razão, tem sido proposto que a presença de altos níveis de colesterol incorporado à membrana espermática interfere no padrão fisiológico de capacitação espermática e ocorrência de reação acrossomal (BRINSKO et al., 2007). O objetivo deste trabalho é rever aspectos relacionados com adição de CLC à membrana de espermatozoides equinos, bem como sua influência sobre o processo de capacitação espermática e reação acrossomal.

HIPÓTESE

A incorporação de colesterol à membrana espermática possivelmente tornará viável a utilização da IA com sêmen refrigerado e transportado de garanhões que anteriormente possuíam baixa resistência à refrigeração.

OBJETIVO GERAL

Melhorar a qualidade espermática e a fertilidade de garanhões *bad cooler*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Determinar a concentração mais adequada de CLC para a utilização na refrigeração de espermatozoides equinos.
- 2- Verificar o efeito das temperaturas de 5° C e 15° C e a interação destas com o tratamento de CLC sobre a viabilidade do sêmen equino refrigerado.
- 3- Avaliar a influência da adição de CLC sobre a qualidade do sêmen refrigerado de garanhões *bad cooler* e *good cooler*.
- 4- Avaliar a influência da adição de CLC sobre a ocorrência de reação acrossomal induzida.
- 5- Avaliar e comparar a fertilidade de garanhões *bad cooler* e *good cooler* tratados ou não com CLC.

Capítulo 2

REVISÃO DE LITERATURA

1. Princípios da criopreservação

Inicialmente o sêmen deve ser resfriado da temperatura corpórea à temperatura ambiente (37° C até 20° C). Este resfriamento não causa maiores danos aos espermatozoides, desde que estejam diluídos adequadamente (MORAN et al., 1992).

O estresse inicial ocorre quando os espermatozoides passam da temperatura ambiente para a temperatura final de armazenagem do sêmen resfriado (MORAN et al., 1992). Esta é uma faixa crítica no processo de refrigeração, devido à ocorrência da fase de transição dos fosfolipídios da membrana plasmática do estado líquido-cristalino para o estado de gel (GRAHAM, 1996). Neste período crítico, mais precisamente de 19° C a 8° C, os espermatozoides devem ser resfriados em uma taxa de refrigeração de 0.05° C por minuto para que não sofram danos irreversíveis, que irão causar queda nos índices de fertilidade (MORAN et al., 1992). Os danos decorrentes dessa faixa de refrigeração são denominados conjuntamente de “choque frio” (WATSON, 1995).

Para evitar o choque térmico, além do controle da curva de refrigeração, é fundamental a utilização de meios diluentes adequados (GRAHAM, 1996). Até o presente, os diluentes de refrigeração mais utilizados na espécie equina são derivações do meio criado por Kenney et al. (1975), que tem na sua composição básica leite desnatado, glicose e antibióticos. Com o emprego de equipamentos comerciais específicos para o transporte de sêmen, a taxa de refrigeração é controlada, sendo obtida uma curva de refrigeração lenta e progressiva até a estabilização a 5° C. Através disso, é possível reduzir os efeitos estressantes e deletérios que são gerados aos espermatozoides, proporcionando uma viabilidade de até 72 horas pós-ejaculação para grande parte dos garanhões (PIMENTEL e CARNEIRO, 2008).

O processo de congelamento de sêmen envolve os seguintes passos: queda de temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento (MEDEIROS et al., 2002). Estas etapas promovem lesões celulares devido a choque térmico, formação de cristais de gelo intracelulares, injúrias oxidativas, estresse osmótico e alterações no DNA (BALL e VOSS, 2001). A faixa crítica de danos durante a congelamento ocorre entre -15° C e -60° C. Após os espermatozoides atravessarem esta faixa de temperatura, a atividade metabólica é cessada e as células permanecem inativas (GRAHAM, 1996).

A congelamento modifica a organização da membrana celular de modo que as características de interação do gameta masculino com as estruturas do trato reprodutivo

feminino são alteradas. De acordo com Bailey et al. (2000), os espermatozoides congelados possuem menor capacidade de adesão às células epiteliais da junção útero-tubárica e do ístimo. Estas regiões atuam como reservatórios para manutenção dos espermatozoides em metabolismo basal, proporcionando maior tempo de viabilidade até o momento da ovulação. Adicionalmente, segundo Moore et al. (2005), a congelação promove em média uma perda de 28% do conteúdo de colesterol da membrana espermática. Este acontecimento contribui para a ocorrência de reações acrossômicas prematuras e consequentemente na diminuição do período de longevidade pós-descongelação.

As alterações celulares decorrentes do processo de congelação são coletivamente conhecidas como “criocapacitação” (BAILEY et al., 2000) e devem ser levadas em consideração para o momento da realização da IA, principalmente nas espécies que possuem o estro prolongado, como é o caso da equina.

Em condições fisiológicas, o espermatozoide equino permanece viável pelo menos 72 horas no oviduto da égua, diferente do oócito que possui viabilidade máxima de 12 horas (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Portanto, devido às modificações que a criopreservação promove nos espermatozoides, existe a necessidade da aplicação de alguns procedimentos para a obtenção de melhores índices de fertilidade. Utilização de dose inseminante com maior concentração espermática, inseminação na extremidade do corno uterino, controle folicular intensivo visando aproximar a IA do momento da ovulação, são estratégias comumente empregadas em programas reprodutivos de equinos (WATSON, 2000).

2. Atuação do colesterol na preservação celular

As diferentes espécies podem ser classificadas de acordo com a resistência espermática à criopreservação. O canino, o coelho e o humano são espécies resistentes, os ovinos e bovinos possuem resistência intermediária, já os suínos e equinos são considerados susceptíveis às lesões causadas pelo frio. Quando analisada a composição da membrana espermática, foi constatado que as espécies resistentes à criopreservação possuem alta relação colesterol:fosfolipídio (DARIN-BENNETT e WHITE, 1977; WATSON, 1981; PARKS e LYNCH, 1992). O garanhão apresenta uma taxa molar de colesterol:fosfolipídio de membrana de 0,36 (PARKS e LYNCH, 1992), valor

consideravelmente menor em relação ao coelho e o homem que possuem respectivamente 0,88 e 0,99 (DARIN-BENNETT e WHITE, 1977).

O colesterol apresenta propriedades que reduzem os danos celulares decorrentes da criopreservação. Na presença de elevados níveis de colesterol na membrana, o choque térmico pode ser evitado, com diminuição da temperatura de ocorrência da fase de transição dos fosfolipídios ou até mesmo impedindo que aconteça este fenômeno (LADBROOKE et al., 1968). Com isso, a membrana espermática permanece em um estado fluído intermediário ao invés do gelatinoso resultante da fase de transição. Adicionalmente, o colesterol também possui ação estabilizadora e moduladora da fluidez de membrana a temperatura corpórea (WATSON, 1981; CROCKETT, 1998).

O espermatozoide equino, quando comparado ao bovino, possui uma estreita faixa de tolerância a variações osmóticas. A adição e remoção de crioprotetores, congelamento e descongelamento são eventos promotores de grandes estresses osmóticos (BALL e VOSS, 2001; GUTHRIE et al., 2002; GLAZAR et al., 2009). Glazar et al. (2009) demonstraram que a adição de colesterol em espermatozoides equinos melhorou a viabilidade pós-descongelamento devido à redução do estresse osmótico. Com o aumento dos níveis de colesterol da membrana ocorre uma elevação no limiar osmótico e na fluidez de membrana, proporcionando maior permeabilidade à água e aos crioprotetores.

Além disso, o colesterol confere maior estabilidade à membrana e um decréscimo na permeabilidade aos cátions (YEAGLE, 1985), como é o caso do cálcio, que está intimamente envolvido no desencadeamento da capacitação espermática. Com isso, a ocorrência de reações acrossômicas precoces é reduzida no momento da fertilização, bem como a longevidade da célula espermática é aumentada. Pamornsakda et al. (2011) adicionaram CLC antes da congelamento em espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões e obtiveram um aumento significativo na porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro após 10 minutos, 2 e 4 horas da descongelamento.

3. Utilização de ciclodextrinas

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que inicialmente eram produzidos através da degradação enzimática do amido. Após o conhecimento da capacidade de formação de compostos de inclusão estáveis com moléculas hidrofóbicas

em soluções aquosas, iniciou-se a sintetização de ciclodextrinas puras (SAENGER, 1980).

Dentre as principais formas reconhecidas, as β -ciclodextrinas apresentam a estrutura mais adequada para englobar componentes lipídicos. Devido à alta afinidade por esteróides, as ciclodextrinas podem ser utilizadas para modificar as concentrações de colesterol das membranas (KILSDONK et al., 1995; CHOI e TOYODA, 1998; OLIVEIRA et al., 2010).

As ciclodextrinas possuem a capacidade de formar compostos de inclusão com uma variedade de moléculas naturais e sintéticas como hormônios, vitaminas e compostos lipídicos. Para desenvolver essa função carreadora de substâncias para as membranas, a ciclodextrina deve estar previamente ligada às moléculas a serem carregadas e as mesmas devem caber inteira ou parcialmente na cavidade da mesma (SAENGER, 1980; NAVRATIL et al., 2003). Estes oligossacarídeos possuem estrutura em formato de cone, com as extremidades externas hidrofílicas e a face interna hidrofóbica, com isso, são capazes de dissolver, carrear e aumentar a solubilidade em meios aquosos de compostos hidrofóbicos, como é o caso do colesterol (DOBZIUK, 2006).

A habilidade da β -ciclodextrina associada a seu complexo de inclusão de alterar o conteúdo lipídico da membrana plasmática é devido à capacidade de estabelecimento de um equilíbrio entre os níveis de CLC com o colesterol contido na membrana. Logo, a incubação de células unicamente com ciclodextrina provoca a remoção de colesterol da membrana plasmática. De outra maneira, após a adição de CLC à células contendo baixos níveis de colesterol ocorre a incorporação do lipídio na membrana (KLEIN et al., 1995).

Oliveira et al. (2010) utilizaram a metil- β -ciclodextrina para remoção parcial do colesterol da membrana após a descongelação em espermatozoides equinos criopreservados previamente incubados com CLC. No entanto, as concentrações empregadas de metil- β -ciclodextrina no experimento não foram suficientes para restabelecer a responsividade dos espermatozoides a indução de reação acrossômica com cálcio ionóforo.

4. Capacitação espermática e reação acrossômica

Após a ejaculação, bilhões de espermatozoides são depositados no trato reprodutor da fêmea. Contudo, normalmente apenas um espermatozoide irá fertilizar o oócito. Para garantir que ocorra esse processo, existem mecanismos altamente regulados de interação entre os gametas e a fertilização.

O espermatozoide é composto por três regiões altamente especializadas. A cabeça, que contém o DNA e é fundamental para a interação do espermatozoide com o oócito. A peça intermediária, na qual estão localizadas as mitocôndrias responsáveis pela produção de energia para a célula, e o flagelo, que atua na motilidade espermática (GADELLA et al., 2001).

A região da cabeça do espermatozoide, além do núcleo, possui no seu extremo apical o acrossoma, uma vesícula que contém enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração na zona pelúcida e subsequente fertilização do oócito (YANAGIMACHI, 1994). Ainda no limite entre a membrana que recobre o acrossomo e a região caudal ao mesmo, existe a zona equatorial, local de ligação e fusão do espermatozoide com o oolema (GADELLA et al., 2001).

Para que o espermatozoide exerça sua função, é necessário adquirir a capacidade de realizar as etapas que antecedem a fertilização. Para tanto, após a ejaculação a célula sofre uma série de mudanças metabólicas e estruturais durante o transporte pelo trato reprodutor feminino. Essas mudanças são coletivamente denominadas capacitação espermática (YANAGIMACHI, 1994). O aspecto fundamental desse fenômeno são as modificações que tornam o espermatozoide apto a sofrer reação acrossômica em resposta à ligação à zona pelúcida (WATSON, 1995).

O primeiro passo na capacitação espermática é o aumento intracelular de cálcio, bicarbonato e peróxido de hidrogênio, que juntos irão estimular a produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que por sua vez ativará a proteína quinase A (PKA) para fosforilar proteínas da membrana (WITTE e SCHÄFER-SOMI, 2007). A capacitação também promove mudanças no padrão do movimento, conferindo à célula um estado de hipermotilidade. Com isso, o espermatozoide consegue se desligar do epitélio do oviduto, progredir pelo mesmo e penetrar na zona pelúcida (DEMOTT e SUAREZ, 1993; YANAGIMACHI, 1994; RATHI et al., 2001).

O processo de interação entre o espermatozoide e o oócito envolve uma sequência de eventos. Após aderir ao oócito, o espermatozoide desencadeia o processo

de reação acrossômica (Figura 1, itens a, b). Mais especificamente, a ligação à zona pelúcida estimula um influxo de cálcio intracelular, que vai gerar aumento da fluidez e fusão das membranas plasmática e acrossomal externa. Após essa fusão são liberadas enzimas hidrolíticas do interior do acrossoma que irão permitir sua penetração pela zona pelúcida (GADELLA et al., 2001; GADELLA, 2008).

Com a perda das membranas externas, a membrana acrossomal interna fica exposta e entra em contato com a zona pelúcida, ocorrendo a passagem ao espaço perivitelínico (Figura 1, item c). Através da zona equatorial o espermatozoide e o oolema iniciam a fusão e o gameta masculino finalmente é englobado para o interior do oócito (Figura 1, item d). Para evitar que haja a fertilização de outros espermatozoides, após a ativação do gameta feminino ocorre o bloqueio à polispermia, onde são secretados grânulos corticais que tornam a zona pelúcida intransponível aos gametas masculinos (Figura 1, item e) (GADELLA et al., 2001; GADELLA, 2008).

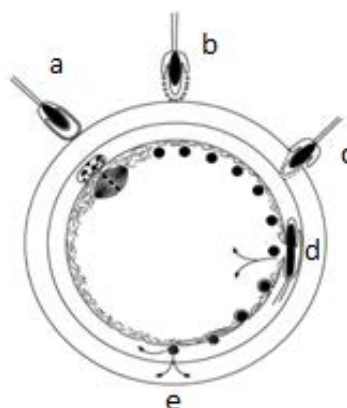


Figura 1. Representação sequencial dos eventos de interação entre o espermatozoide e oócito que antecede a fertilização. Fonte: Gadella et al. (2001). Ligação do espermatozoide à zona pelúcida (a) e reação acrossômica (b). Penetração através da zona pelúcida ao espaço perivitelínico (c). Ligação e fusão do espermatozoide ao oolema (d). Secreção de grânulos corticais com bloqueio à polispermia (e).

Uma importante etapa da capacitação e reação acrossômica é a ocorrência da desestabilização da membrana plasmática. Alterações na composição dos lipídios e fosfolipídios geram essa desestabilização, que por sua vez levará a um aumento na fluidez da membrana plasmática, possibilitando a fusão com a membrana acrossomal externa (FLESCH e GADELLA, 2000). Portanto, o colesterol possui um papel

fundamental nesse mecanismo, visto que seu efluxo da membrana acrossomal durante a passagem pelo trato feminino é um fenômeno obrigatório para o desencadeamento do processo de capacitação espermática (CROSS, 1998; TRAVIS e KOPF, 2002).

O colesterol é considerado um lipídeo não integral de membrana, isto é, pode se desassociar facilmente da membrana plasmática (NOLAN e HAMMERSTEDT, 1997). Após a ejaculação, substâncias decapacitantes (tais como o colesterol) e que são oriundas do trânsito epididimário e do com o plasma seminal encontram-se ligadas à superfície do acrossomo. De acordo com Gadella et al. (2001), a taxa de capacitação depende do efluxo de colesterol da membrana do espermatozoide. Adicionalmente, Davis (1981) demonstrou que quanto maior a taxa molar de colesterol:fosfolipídio da membrana, maior o tempo necessário para que ocorra a capacitação espermática. Os espermatozoides de suínos e ovinos demoram no máximo duas horas para capacitar, em contrapartida coelhos e humanos que possuem alta taxa molar de colesterol:fosfolipídio demoram até sete horas.

5. Incorporação de colesterol à membrana espermática

Após o conhecimento das propriedades fisiológicas do colesterol sobre as membranas, estudos foram desenvolvidos nas espécies susceptíveis ao choque térmico a fim de melhorar os resultados de fertilidade dos programas reprodutivos que utilizam sêmen criopreservado (ZAHN et al., 2002; PURDY e GRAHAM, 2004; MOCÉ et al., 2010; FARSHAD et al., 2011).

Combes et al. (2000) testaram a incorporação de CLC à membrana de espermatozoides equinos previamente a congelação. Após a descongelação, melhoras significativas foram obtidas nos parâmetros de motilidade total, progressiva e porcentagem de células rápidas, além do aumento de integridade de membrana. Mesmo alcançando bons resultados laboratoriais, não foi realizado teste de fertilidade. Segundo Moore et al. (2005), através do tratamento dos espermatozoides com CLC é possível aumentar em mais de duas vezes os níveis de colesterol da membrana em relação às concentrações iniciais. Dessa forma, os espermatozoides podem adquirir taxas de colesterol semelhantes aos animais resistentes ao choque térmico.

Assim como em equinos, todas as espécies susceptíveis ao choque térmico avaliadas quanto à adição de CLC à membrana espermática responderam positivamente através da melhora das características espermáticas pós-descongelação. Os parâmetros

mais favorecidos foram os de motilidade total e integridade de membrana (COMBES et al., 2000; PURDY e GRAHAM, 2004; MOCÉ et al., 2010; FARSHAD et al., 2011).

A utilização de CLC também gera benefícios para a refrigeração de espermatozoides equinos (KIRK et al., 2001; TORRES et al., 2006; CRESPILO et al., 2013). Torres et al. (2006) observaram um aumento na motilidade total, progressiva e de integridade de membrana até 72 horas de refrigeração com a incorporação de CLC em espermatozoides equinos refrigerados a 5° C. Estes resultados foram semelhantes aos reportados por Kirk et al. (2001), que além disso observaram que os espermatozoides dos garanhões com baixa resistência à criopreservação são os mais favorecidos com o tratamento com CLC. Mesmo com a obtenção de bons resultados *in vitro*, até o presente momento, somente Hartwig et al. (2013) obtiveram um aumento de 42% nas taxas de concepção por ciclo em relação ao grupo controle em espermatozoides equinos tratados com CLC e refrigerados por 24 horas a 5° C.

Durante o processo de capacitação, o efluxo de colesterol da membrana é essencial para o desencadeamento da capacitação e reação acrossômica (GADELLA et al., 2001). Portanto, o colesterol presente em altos níveis na membrana, possui a capacidade modificar o padrão fisiológico de capacitação e reação acrossômica (ZAHN et al., 2002).

Spizziri et al. (2010) testaram diferentes indutores de reação acrossômica em espermatozoides equinos tratados ou não com CLC e verificaram que quando utilizado cálcio ionóforo (A23187) e lisofosfatidilcolina (LPC) ambos os grupos responderam positivamente à indução de reação acrossômica. Em contrapartida, a dilauroilfosfatidilcolina (PC12) empregada em diferentes concentrações, não induziu reação acrossomal ao grupo tratado com CLC. Tais achados sugerem que a membrana espermática tratada com CLC, em função de adquirir maior teor de colesterol, torna-se mais estável e provavelmente necessita de mais tempo ou maior estímulo para sofrer a capacitação espermática e posterior reação acrossômica. Entretanto, diferente do que foi cogitado por Brinsko et al. (2007), a membrana do espermatozoide tratado com CLC não sofre modificações que a torne irresponsiva aos estímulos de desencadeamento de capacitação e reação acrossômica (OLIVEIRA et al., 2010; SPIZZIRI et al., 2010).

Outra característica fisiológica importante foi demonstrada por Moore et al. (2005) e Spizziri et al. (2010), que comprovaram através da utilização de oócitos bovinos, não haver mudanças na composição da membrana que pudessem prejudicar o reconhecimento e a ligação dos espermatozoides tratados com CLC à zona pelúcida.

A adição de colesterol à membrana dos espermatozoides equinos possibilita um aumento na resistência ao processo de criopreservação (COMBES et al., 2000; KIRK et al., 2001; MOORE et al., 2005; TORRES et al., 2006). No entanto, mesmo com a melhora gerada às características espermáticas, quando utilizado CLC são reportados resultados de fertilidade inferiores em relação aos animais não tratados (ZAHN et al., 2002; SPIZZIRI et al., 2010).

Zahn et al. (2002) investigaram a fertilidade do sêmen equino congelado previamente tratado com CLC. Apesar do aumento da integridade de membrana plasmática pós-descongelamento do grupo CLC em relação ao grupo controle (48,7% contra 43,9%), as taxas de prenhez por ciclo do grupo CLC foram menores que as do grupo controle (25% contra 75%). Spizziri et al. (2010) também observaram que apesar de os espermatozoides tratados com CLC terem respondido aos indutores de reação acrossômica e se ligado semelhantemente à zona pelúcida de oócitos bovinos, apresentaram 15% de taxas de prenhez por ciclo contra 28,6% do grupo controle.

Assim como relatado na espécie humana (MOGHISSI E WALLACH, 1983; CALVO et al., 1994), existe uma população de garanhões classificados como sub-férteis, porém, sem causa definida. Estes animais apresentam parâmetros espermáticos adequados, porém, com taxas máximas de prenhez por ciclo de 15% (BRINSKO et al., 2007). Após analisada a composição do plasma seminal e membrana dos espermatozoides dos animais sub-férteis, foi constatado que as taxas molares de colesterol:fosfolípidios eram mais que o dobro em relação aos garanhões considerados férteis. Diferente dos resultados de Spizziri et al. (2010), os animais sub-férteis apresentaram baixa porcentagem de reação acrossômica frente à indução com cálcio ionóforo (BRINSKO et al., 2007).

Os dados apresentados evidenciam a influência do colesterol sobre a capacitação e a reação do acrossomo. Uma hipótese para a diminuição da fertilidade dos espermatozoides tratados com CLC seria pelas modificações nas características fisiológicas de permeabilidade aos íons e de fluidez de membrana, tornando a célula mais estável e dificultando o influxo de cálcio. Com esse influxo reduzido, a adenilciclase não é ativada e o padrão de capacitação espermática e reação acrossômica são alterados (YEAGLE, 1985; HOLT e NORTH, 1986; OLIVEIRA et al., 2010).

Frente a essa situação, uma alternativa a ser pensada, seria a criação de protocolos específicos para a realização de IA com sêmen criopreservado tratado com CLC. Devido ao maior teor de colesterol incorporado à membrana plasmática,

possivelmente a demanda de tempo para ocorrência da capacitação espermática seja maior (ZAHN et al., 2002; SPIZZIRI et al., 2010). Portanto, futuramente seria de grande importância à realização de testes laboratoriais que auxiliassem na determinação do momento do ciclo mais adequado para a realização da IA. Através dessas informações seria possível, até mesmo, o desenvolvimento de um protocolo de IA em tempo fixo utilizando sêmen criopreservado tratado com CLC, o que tornaria viável a utilização dessa técnica na rotina reprodutiva equina.

REFERÊNCIAS

AURICH, J.E.; AURICH, C. Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. **Reprod Domestic Anim**, v.41, p.275–9, 2006.

AURICH, C. Recent Advances in cooled-semen technology. **Anim Reprod Sci**, v.107, p.268–75, 2008.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Sperm cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J Androl**, v.21, p.1-7, 2000.

BALL, B.A.; VOSS, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **J Androl**, v.22, p.1061-9, 2001.

BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v.54, p.129-36, 2000.

BRINSKO, S.P.; LOVE, C.C.; BAUER, J.E.; MACHPERSON, M.L.; VARNER, D.D. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. **Anim Reprod Sci**, v.99, p.65-71, 2007.

CALVO, L.; DENNISON-LAGOS, L.; BANKS, S.M.; SHERINS, R.J. Characterization and frequency of acrosome reaction among normal and infertile men. **Hum Reprod**, v.9, p.1875-9, 1994.

CHOI, Y.H.; TOYODA, Y. Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in protein-free medium. **Biol Reprod**, v.59, p.1328-33, 1998.

COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; SCHROEDER, F.; BURGHARDT, R.C.; BLANCHARD, T.L. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. **J Reprod Fertil Suppl**, v.56, p.127-32, 2000.

CRESPILHO, A.M.; SPIZZIRI, B.E.; MEYERS, M.; GRAHAM, J.K. The Effect of Cholesterol addition, buffer, and pH on equine sperm stored at 5° C. **J Equine Vet Sci**, v.33, p.663-666, 2013.

CROCKETT, E.L. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. **Am Zool**, v.38, p.291-304, 1998.

CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biol Reprod**, v.59, p.7-11, 1998.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v.14, p.466-70, 1977.

DAVIS, B.K. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/ phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. In: **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.78, p.7560-64, 1981.

DEMOTT, R.P.; SUAREZ, S.S. Hyperactivated sperm progression in the mouse oviduct. **Biol Reprod**, v.46, p.779-85, 1993.

DOBZIUK, H. **Molecules with holes – cyclodextrins**. In: Dobziuk H. Cyclodextrins and their complexes, Weinheim, Germany, p.1-30, 2006.

FARSHAD, A.; AMIDI, F.; KOOHI-KHOR, A.; RASHIDI, A. Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin in presence and absence of egg yolk during freezing step on quality of Markhoz Buck's spermatozoa. **Asian Australas J Anim Sci**, v.24, p.181-9, 2011.

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

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.H.M.; STOUT, T.A.E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and acrosome reaction in equine sperm. **Anim Reprod Sci**, v.68, p.249-65, 2001.

GADELLA, B.M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Anim Reprod Sci**, v.107, 229-36, 2008.

GLAZAR, A.; MULLEN, S.F.; LIU, J.; BENSON, J.D.; CRITSER, J.K.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Criobiology**, v.59, p.201-6, 2009.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v.12, p.131-47, 1996.

GUTHRIE, H.D.; LIU, J.; CRITSER, J.K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biol Reprod**, v.67, p.1811-6, 2002.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Fisiologia da Reprodução Animal**. In: Hafez ESE, Hafez B. 2ª ed. Reprodução Animal, São Paulo: Manole, 2004, p.104-126.

HARTWIG, F.P.; LISBOA, F.P.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R.D.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A. **Reprod Fertil Dev**, v.25(1), p.158, 2013.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. **J Reprod Fertil Suppl**, v.78, p.447-57, 1986.

KENNEY, R.M.; BERGMANN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. **In: Proceedings of American Association of Equine Practitioners**, v.21, p.327-49, 1975.

KILSDONK, E.P.C.; YANCEY, P.G.; STOUT, G.W.; WEN BANGERTER, F.; JOHNSON, W., PHILLIPS, M.C.; ROTHBLAT, G.H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. **J Biol Chem**, v.270, p.17250-6, 1995.

KIRK, E.S.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. **Anim Reprod Sci**, v.68, p.315-65, 2001.

KLEIN, U.; GIMPLI, G.; FAHRENHOLZ, F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with β -cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. **Biochemistry**, v.34, p.13784-93, 1995.

LADBROOKE, D.C.; WILLIAMS, R.M.; CHAPMAN, D. Studies on lecithin-cholesterol-water interaction by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. **Biochim Biohys Acta**, v.150, p.333-40, 1968.

LOOMIS, P.R.; GRAHAM, J.K. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Anim Reprod Sci**, v.105, p.119-28, 2008.

LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. **Anim Reprod Sci**, v.68, p.191-200, 2001.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-44, 2002.

MOCÉ, E.; PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. **Anim Reprod Sci**, v.118, p.236-47, 2010.

MOGHISSI, K.S.; WALLACH, E.E. Unexplained infertility. **Fertil Steril**, v.39, p.5-21, 1983.

MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v.51, p.241-9, 2005.

MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.999-1012, 1992.

NAVRATIL, A.M.; BLISS, S.P.; BERGHORN, K.A.; HAUGHIAN, J.M.; FARMERIE, T.A.; GRAHAM, J.K.; CLAY, C.M.; ROBERSON, M.S. Constitutive localization of the gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. **J Biol Chem**, v.278, p.31593-602, 2003.

NOLAN, J.P.; HAMMERSTEDT, R.H. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. **FASEB J**, v.11, p.670-82, 1997.

OLIVEIRA, C.H.; VASCONCELOS, A.B.; SOUZA, F.A.; MARTINS-FILHO, O.A.; SILVA, M.X.; VARAGO, F.C.; LAGARES, M.A. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. **Anim Reprod Sci**, v.118, p.194-200, 2010.

PAMORNSAKDA, T.; POJPRASATH, T.; SUWIMONTEERABUTR, J.; THARASANIT, T. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm. **Cryobiology**, v.63, p.90-5, 2011.

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v.29, p.255-66, 1992.

PIMENTEL, C.A.; CARNEIRO, G.F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução de Equinos**. In: Gonçalves BDG, Figueiredo RF, Freitas VJF. 2ªed. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal, São Paulo: Roca, 2008, p.145-159.

PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v.48, p.36-45, 2004.

RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M.; GADELLA, B.M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biol Reprod**, v.65, p.462-70, 2001.

SAENGER, W. **Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry**. Angew Chem Int Ed Engl, v.19, p.344-62, 1980.

SPIZZIRI, B.E.; FOX, M.H.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallion's spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v.118, p.255-64, 2010.

TORRES, P.; SERRES, C.; GOMEZ-CUÉTERA, C.; SANTIAGO, I.; MATEOS, E.; ÁLVAREZ, A.L. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on motility and plasma membrane integrity of cooled stallion sperm. **Anim Reprod Sci**, v.94, p.148-51, 2006.

TRAVIS, A.J.; KOPF, G.S. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. **J Clin Invest**, v.110, p.731-6, 2002.

VARNER, D.D.; LOVE, C.C.; BLANCHARD, T.L.; BLISS, S.B.; CARROL, B.S.; MACPHERSON, M.L. Breeding-Management Strategies and Semen-Handling Techniques for Stallions-Case Scenarios In: **Proceedings of the 56th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, Baltimore, Maryland, USA, p.56, 2010.

WATSON, P.F. **The effects of cold shock on sperm cell membranes**. In: MORRIS, G.J.; CLARK, A. Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. Academic Press, London, 1981:189-218.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fertil Dev**, v.7, p.871-91, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim Reprod Sci**, v.61, p.481-92, 2000.

WITTE, T.S.; SCHÄFER-SOMI, S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrossome reaction of mammalian spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v.102, p.181-93, 2007.

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

YEAGLE, P.L. Cholesterol and the cell membranes. **Biochim Biophys Acta**, v.822, p.267-87, 1985.

ZAHN, F.S.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA, J.A. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. **Theriogenology**, v.58, p.237-40, 2002.

Capítulo 3

**UTILIZAÇÃO DE COLESTEROL LIGADO A CICLODEXTRINA: UMA
ALTERNATIVA PARA GARANHÕES *BAD COOLER***

Hartwig, F.P.^A, Lisboa, F.P.^A, Hartwig, F.P.^B, Monteiro, G.A.^A, Maziero, R.R.D.^A,
Dell`Aqua, C.P.<sup>A</sup>, Alvarenga, M.A.<sup>A</sup>, Papa, F.O.<sup>A</sup>, Dell`Aqua Junior, J.A.^A

^A Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.

^B Departamento de Medicina Social, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

E-mail: dellaquajunior@uol.com.br

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 18610-970, Fone: (14) 38116249, Fax: (14) 38116045, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Resumo

A inseminação artificial com sêmen refrigerado é uma biotecnologia imprescindível para os programas reprodutivos de equinos. Entretanto, durante a refrigeração o espermatozoide pode sofrer danos irreversíveis que irão prejudicar os índices de fertilidade. A incorporação de colesterol ligado a ciclodextrina (CLC) corresponde a uma estratégia para aumentar a resistência espermática a baixas temperaturas. No entanto, o colesterol presente em altos níveis na membrana plasmática interfere no processo de capacitação e consequentemente de fertilização. Os objetivos deste trabalho foram determinar a concentração mais adequada de CLC e a temperatura de refrigeração sobre os

parâmetros de cinética e viabilidade espermática de garanhões *bad cooler* (BC) e *good cooler* (GC); bem como o efeito da adição de CLC sobre a ocorrência de reação acrossômica e sobre os índices de fertilidade de espermatozoides refrigerados. No experimento 1, cada ejaculado foi dividido em quatro grupos: controle (C) e tratado com 1 mg (CLC-1), 1,5 mg (CLC-1,5) e 2 mg (CLC-2) de CLC/120 x 10⁶ de espermatozoides e refrigerado por 48 horas a 5° C. No experimento 2, cada ejaculado foi dividido em quatro grupos: C e CLC-1,5 refrigerados a 15° C e a 5 ° C por 24 horas. Para o experimento 3, foram utilizados garanhões GC e BC e os ejaculados divididos em: C e CLC-1,5 refrigerados a 5° C por 48 horas. Nos experimentos 1, 2 e 3 foi analisada a cinética espermática (CE) e integridade da membrana plasmática (IMP) antes da refrigeração e após 24 e 48 horas de refrigeração. No experimento 4, os ejaculados foram divididos em 4 grupos: C e CLC-1,5 mantidos à fresco ou refrigerados por 24 horas a 5° C. Cada grupo foi incubado com cálcio ionóforo a 37° C por 3 horas. As análises de reação acrossomal (ACR) foram efetuadas antes e após 1, 2 e 3 horas de incubação. Para o experimento 5 foram utilizados dois ciclos de 10 éguas para um garanhão GC e 2 ciclos de 25 para um garanhão BC. Após 24 horas da indução da ovulação as inseminações foram realizadas com os grupos C e CLC-1,5 refrigerados a 5° C por 24 horas. De acordo com os resultados, todos os grupos tratados com CLC apresentaram maior IMP em relação ao grupo C; e CLC-1,5 e CLC-2 apresentaram os melhores resultados de CE. A temperatura de refrigeração de 5° C foi superior a 15° C quando os espermatozoides foram tratados com CLC. Os garanhões GC e BC foram beneficiados com o tratamento de CLC-1,5 entretanto, os BC foram os mais favorecidos visto que além da CE obtiveram também um incremento na IMP. Houve um atraso na capacitação de pelo menos 3 horas nos espermatozoides frescos e de pelo menos 1 hora nos refrigerados após a adição de CLC-1,5. Após a adição de CLC-1,5 a fertilidade do

garanhão BC foi significativamente aumentada, contudo, a do GC não sofreu alteração. Conclui-se que a incorporação de CLC é uma técnica eficiente para a refrigeração de sêmen equino, no entanto, é indicada principalmente para garanhões BC.

Palavras-chave: sêmen equino, refrigeração, colesterol, fertilidade.

1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial com sêmen refrigerado é uma biotecnia fundamental para os atuais programas reprodutivos de equinos. Com a refrigeração à 5° C é possível reduzir o metabolismo celular e aumentar o tempo de viabilidade dos espermatozoides após o ejaculado, permitindo a realização de inseminações entre 24 a 48 horas de armazenamento [1]. Entretanto, entre as temperaturas de 19° C e 8° C o espermatozoide sofre uma transição de estado dos fosfolipídios da membrana plasmática, passando de um estado líquido para um estado de gel [2]. Essa mudança gera uma redução na fluidez de membrana e maior predisposição a lesões por rupturas, bem como alterações na organização lipídica e proteica original que irão comprometer a funcionalidade da célula [3, 4, 5].

A taxa de colesterol/fosfolipídio da membrana plasmática é o principal fator para manutenção da fluidez e estabilidade da membrana durante a refrigeração [6, 7]. O colesterol presente em altas concentrações atua reduzindo a temperatura de ocorrência da fase transição e mantém o estado fluído a baixas temperaturas, consequentemente reduzindo os danos a estrutura da membrana plasmática [3]. Espermatozoides de espécies que apresentam alto teor de colesterol na membrana, como os coelhos e humanos, possuem maior resistência frente ao processo de criopreservação [6]. Em contrapartida, os equinos possuem somente 36% de colesterol na membrana e são considerados mais susceptíveis a crioinjúria [4]. Além disso, existem diferenças na

composição lipídica de membrana entre indivíduos da mesma espécie, as quais podem justificar as variações na resistência espermática aos processos de refrigeração e congelamento. Neste sentido, existem os ganhões classificados como *bad cooler*, que apresentam queda abrupta de fertilidade após o processamento, refrigeração e transporte do sêmen, situação que limita a utilização desses animais e causa significativas perdas econômicas [8, 9].

Com o intuito de conferir maior resistência a baixas temperaturas, é possível aumentar o teor de colesterol da membrana espermática equina previamente ao processo de refrigeração por meio da adição do colesterol ligado à ciclodextrina (CLC) [10, 11, 12, 13]. A ciclodextrina é um oligossacarídeo que possui em sua estrutura uma face externa hidrofílica e uma interna hidrofóbica, através dessa característica é capaz de dissolver, carrear e aumentar a solubilidade em soluções aquosas de compostos hidrofóbicos, como é o caso do colesterol [14].

Apesar da poderosa ação protetora do CLC para a manutenção da qualidade espermática, alguns trabalhos apontam que níveis elevados de colesterol presentes na membrana interferem no processo fisiológico de capacitação espermática e reação acrossômica [10, 15]. Adicionalmente, os testes de fertilidade realizados até o momento com sêmen congelado demonstraram não haver benefício ou até mesmo um efeito negativo com o uso de CLC [10, 16]. Diferentemente do processo de congelamento, no qual parece estar estabelecida a concentração ideal de CLC, na refrigeração de sêmen equino ainda há uma grande variação nas doses de CLC empregadas [12, 13, 17].

Os objetivos deste trabalho foram determinar a concentração mais adequada de CLC e a temperatura de refrigeração sobre os parâmetros de cinética e viabilidade de ganhões *bad cooler* e *good cooler*, bem como o efeito da adição de CLC sobre a

ocorrência de reação acrossômica e índices de fertilidade *in vivo* de espermatozoides refrigerados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes usados neste estudo foram adquiridos da Sigma Aldrich, St. Louis, USA.

2.1 Preparação do colesterol ligado à ciclodextrina

O colesterol ligado à ciclodextrina utilizado neste experimento foi preparado como descrito por Purdy e Graham [18].

2.2 Animais e processamento das amostras

O experimento foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista da cidade de Botucatu (FMVZ – UNESP/Botucatu), localizada no estado de São Paulo a 22°53'09" de latitude sul e 48°26'42" de longitude oeste. O trabalho foi realizado durante a estação reprodutiva, entre outubro de 2011 até abril de 2012. Foram utilizados 30 garanhões das raças Mangalarga Marchador, Quarto de Milha e Brasileiro de Hipismo e 35 éguas mestiças com idade variando entre 4 e 18 anos. Os garanhões estavam localizados no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ-UNESP/Botucatu, Ogar (Haras particular, Lins, SP, Brasil), Itapuã (Haras particular, Arandú, SP, Brasil) e LUB (Centro reprodutivo particular, Cesário Lange, SP, Brasil), permaneciam estabulados, com alimentação à base de feno, concentrado e água *ad libitum*. As éguas encontravam-se na FMVZ-UNESP/Botucatu e possuíam alimentação semelhante aos garanhões, porém ficavam soltas em piquetes.

Após a colheita do ejaculado com vagina artificial o sêmen foi filtrado, diluído na proporção de 1:1, avaliado quanto à motilidade e concentração espermática através de Câmara de Neubauer. Imediatamente após as avaliações iniciais as amostras foram ajustadas para a concentração de 50×10^6 de espermatozoides/mL com diluidor Botu-Sêmen[®] (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil).

2.3 Análises espermáticas

2.3.1 Cinética espermática

Cinco campos para cada amostra foram selecionados para avaliação da cinética espermática pelo CASA (HTM-IVOS 12, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA). Sendo analisados os parâmetros de motilidade espermática total (MT, %), motilidade espermática progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) e porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP, %). O setup do CASA utilizado neste experimento está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Metodologia da análise computadorizada (CASA) da cinética espermática de equinos.

Parâmetro	Ajustado para
Número de frames	30
Contraste mínimo	60 pixels
Tamanho mínimo da célula	3 pixels
Contraste para células estáticas	30 pixels
Linearidade	80%
Média mínima para VAP	30.0 $\mu\text{m}/\text{Segundo}$
Mínimo VAP para células progressivas	70.0 $\mu\text{m}/\text{Segundo}$
Mínimo VSL para células lentas	20.0 $\mu\text{m}/\text{Segundo}$
Tamanho de cabeças estáticas	0.62 – 2.98
Intensidade de cabeças estáticas	0.24 – 1.19
Elongação de cabeças estáticas	100 – 0
Magnificação	1.95×
Temperatura	37° C

2.3.2 Integridade da membrana plasmática

A avaliação da integridade de membrana plasmática (IMP, %) foi efetuada por microscopia de epi-fluorescência (Leica Microsystem – DMLB, Alemanha) através da associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio e diacetato de 6-carboxifluoresceína [19].

2.3.3 Taxa de reação acrossomal

A avaliação de reação acrossômica (ACR, %) foi efetuada por citometria de fluxo, através da associação das sondas fluorescentes Hoechst 33342, Iodeto de propídio e fluoroisotiocinato conjugado a *Pisum sativum* (FITC-PSA), como descrito por Freitas-Dell'Aqua [20]. Para isto, foi utilizado o equipamento BD LSR Fortessa (Becton

Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW; vermelho 640-nm, 40 mW e violeta 405-nm. Os dados foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ software v6.1.

2.4 Experimento 1: Avaliação de diferentes concentrações de CLC para a refrigeração de espermatozoides equinos

Foram utilizados dois ejaculados de 24 garanhões. Após a colheita, os ejaculados foram processados conforme já descrito no item 2.2 e fracionados em quatro alíquotas conforme a descrição abaixo:

Controle (C): Botu-Sêmen®

CLC-1: Botu-Sêmen® + 1 mg de CLC/120 x 10⁶ de espermatozoides

CLC-1,5: Botu-Sêmen® + 1,5 mg de CLC/120 x 10⁶ de espermatozoides

CLC-2: Botu-Sêmen® + 2 mg de CLC/120 x 10⁶ de espermatozoides

Antes de serem refrigeradas a 5° C, as amostras foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente (22° C) e os parâmetros espermáticos foram avaliados conforme a descrição do item 2.3.1 e 2.3.2 em diferentes momentos: até duas horas após a diluição com Botu-Sêmen® (T0) e após 24 (T24) e 48 horas (T48) de refrigeração a 5° C. Até o momento T24 as amostras permaneciam em sistema de refrigeração passiva para transporte de sêmen equino modelo Botu-Flex® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), após este período as amostras foram transferidas para uma geladeira comercial (Minitube do Brasil®, Porto Alegre, RS, Brasil) até o momento T48.

2.5 Experimento 2: Efeito da temperatura de refrigeração de espermatozoides equino suplementado ou não com CLC.

Foram utilizados dois ejaculados de 12 garanhões. Após o processamento do ejaculado conforme o experimento 1, o sêmen foi dividido em dois grupos: C e CLC-1,5. Em seguida, as amostras foram acondicionadas nas temperaturas de 15° C e 5° C na Botu-Flex[®] (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil). As características espermáticas avaliadas neste experimento foram MT, MP, RAP e IMP, nos momentos T0 e T24.

2.6 Experimento 3: Influência da adição de CLC sobre a qualidade do sêmen refrigerado de garanhões *bad cooler* e *good cooler*

Foram utilizados dois ejaculados de nove garanhões *good cooler* (GC) e nove *bad cooler* (BC). A classificação dos garanhões em BC e GC foi adaptada de Brinsko [8], sendo que neste experimento determinada de acordo com a diminuição da porcentagem de MT após 24 horas de refrigeração à 5° C, em relação a T0. Foram considerados BC os animais que apresentaram diminuição $\geq 30\%$ e GC diminuição $\leq 20\%$ de MT. Os ejaculados foram processados conforme os experimentos anteriores e divididos em duas alíquotas: C e CLC-1,5 refrigerados a 5° C por 48 horas.

As análises das características espermáticas foram efetuadas conforme a descrição do item 2.3.1 e 2.3.2 nos momentos T0, T24 e T48.

2.7 Experimento 4: Influência da adição de CLC sobre a ocorrência de reação acrossômica de espermatozoides equinos frescos e refrigerados

Foram utilizados dois ejaculados de cinco garanhões. O sêmen foi processado conforme os experimentos anteriores e as amostras divididas nos seguintes grupos: espermatozoides frescos ou refrigerados a 5° C por 24 horas e suplementados (CLC 1,5)

ou não (Controle) com CLC. Para indução da capacitação espermática e reação acrossômica, quatro alíquotas de 5 mL de cada ejaculado previamente diluídas foram incubadas a 37° C com 10 µM de cálcio inóforo (A23187). As análises de ACR foram realizadas nos espermatozoides frescos e após a refrigeração em quatro momentos: antes e após 1, 2 e 3 horas de incubação com A23187.

2.8 Experimento 5: Fertilidade do sêmen refrigerado de garanhões *bad cooler* e *good cooler* tratados ou não com CLC

Foi utilizado um garanhão BC e um GC, enquadrados na classificação descrita no experimento anterior e com histórico de fertilidade conhecida, onde a taxa de prenhez por ciclo utilizando sêmen refrigerado desses garanhões era menor de 50% para o garanhão BC e maior de 70% para o GC.

Para o teste de fertilidade foram utilizados dois ciclos de 25 éguas para o garanhão BC e dois ciclos de 10 éguas para o garanhão GC. O sêmen foi diluído inicialmente como descrito no item 2.2 e processado conforme o grupo a ser utilizado para a inseminação artificial (IA): C e CLC-1,5 refrigerados a 5° C por 24 horas. As IA foram realizadas aleatoriamente no sistema *cross over* com os garanhões *bad* e *good cooler*.

Para a realização das IA as éguas foram monitoradas diariamente até a presença de um folículo de 35 mm de diâmetro em um dos ovários. Neste momento foi realizada a indução da ovulação com 1 mg (im) de acetato de deslorelina (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e o sêmen foi coletado e processado como descrito anteriormente. Vinte e quatro horas após o momento da indução da ovulação as éguas foram inseminadas com 1×10^9 espermatozoides/mL. Todas as éguas em que não foi constatada a ovulação 24 horas após a IA, o ciclo foi descartado e o seguinte foi utilizado. Após 14 dias da

detecção da ovulação foi realizado o diagnóstico de gestação por ultrassonografia (Pie Medical Falco 100[®], Nutricell, Campinas, SP, Brasil) e interrompidas com a aplicação de 5 mg (im) de dinoprost trometamina (Lutalyse[®], Nutrivet, Jaguariúna, SP, Brasil).

2.9 Análises estatísticas

Para as análises laboratoriais das características espermáticas dos grupos estudados foi efetuada por ANOVA robusta (baseada em permutação) com medidas repetidas em todas as vias (diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$). Quando detectadas diferenças significativas no efeito do tratamento ou da interação entre tempo e tratamento, realizou-se a análise *post-hoc* através da comparação entre os intervalos de confiança obtidos pelo método de *bootstrap* entre cada grupo, ajustados de acordo com o número de comparações ($p < 0,0125$). Para as análises de reação acrossômica foi efetuado o teste-t pareado, com valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significantes. Já para o teste de fertilidade foi efetuado o teste exato de Fischer e considerada diferença estatística quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa R versão 2.15.3 [21], com o pacote *lmPerm* para ANOVA baseada em permutação [22].

3. RESULTADOS

Experimento 1

Nos momentos T24 e T48 os grupos CLC-1,5 e CLC-2 apresentaram valores de MT, MP e RAP superiores ao CLC-1 e ao controle, sendo que o CLC-1 demonstrou valores significativamente maiores que o grupo controle (Tabela 2). Já para os parâmetros de VAP, VSL, VCL e IMP nos momentos T24 e T48 todos os grupos

suplementados com CLC apresentaram valores significativamente maiores que os observados no controle (Tabela 2 e 3).

Experimento 2

Em relação ao efeito da temperatura de refrigeração sobre a suplementação ou não com CLC para os parâmetros MT, MP, RAP e IMP foi verificado que os dados obtidos no grupo controle foram similares independente da temperatura utilizada. Entretanto, quando as amostras foram suplementadas com CLC 1,5 os parâmetros de MT e MP a temperatura de 5° C foram superiores. Em contrapartida, as características espermáticas RAP e IMP apresentaram valores semelhantes nas duas temperaturas estudadas. Ao compararmos a adição ou não do CLC na temperatura de 5° C, foi verificado que todos os parâmetros foram significativamente maiores no grupo suplementado. Diferentemente do observado a temperatura de 15° C, onde apenas MT e RAP apresentaram valores superiores em relação ao grupo controle (Tabela 4).

Experimento 3

Quando avaliado o efeito da suplementação com CLC sobre a refrigeração de sêmen de garanhões *bad cooler*, verificou-se que nos momentos T24 e T48 todos os parâmetros de cinéticas avaliados foram superiores no CLC-1,5 em relação ao grupo controle (Tabela 5). Já os garanhões *good cooler*, com exceção do VSL no T24 e do VCL no T24 e T48, os demais parâmetros de cinética foram estatisticamente superiores no CLC-1,5 comparados ao grupo controle tanto no T24 como no T48 (Tabela 6). O parâmetro espermático de IMP nos garanhões *good cooler*, não apresentou diferença significativa nos valores obtidos das amostras suplementadas ou não com CLC, independente do momento avaliado (Tabela 7). De outra maneira, nos garanhões *bad*

cooler as amostras suplementadas apresentaram valores significativamente superiores ao grupo controle em T24 e T48 (Tabela 7).

Experimento 4

Analisando a influência da suplementação com CLC sobre a taxa de reação acrossômica, verificou-se que no sêmen fresco somente a partir de duas horas o grupo controle apresentou maiores valores de ACR em relação ao CLC 1,5. Já no sêmen refrigerado, com exceção do momento duas horas, em todos os outros o controle apresentou maiores valores de ACR sobre o grupo CLC 1,5 (Tabela 8).

Experimento 5

Em relação à fertilidade obtida com sêmen refrigerado a 5° C por 24 horas, suplementado ou não com CLC, foi verificado que no garanhão *good cooler* não houve diferença estatística na taxa de prenhez. Em contrapartida, no garanhão *bad cooler* os índices de fertilidade foram significativamente maiores nas amostras suplementadas com CLC em relação ao grupo controle (Tabela 9).

Tabela 2 – Valores médios e erro padrão para MT, MP, VAP, VCL, VSL e RAP de espermatozoides refrigerados a 5° C nos momentos T0, T24 e T48 de amostras suplementadas ou não com CLC.

Tempo (h)	Grupo	MT (%)	MP (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	RAP (%)
T0	C	76 ± 1,4	44 ± 1,1	122 ± 2,8	97 ± 1,5	219 ± 4,7	68 ± 1,9
T24	C	55 ± 2,7 ^c	28 ± 2,3 ^c	105 ± 3,2 ^b	83 ± 2,6 ^b	199 ± 4,6 ^b	45 ± 2,9 ^c
	CLC-1	67 ± 2,1 ^b	38 ± 2,0 ^b	116 ± 2,3 ^a	93 ± 1,9 ^a	212 ± 3,5 ^a	59 ± 2,3 ^b
	CLC-1,5	72 ± 1,7 ^a	43 ± 1,9 ^a	118 ± 2,1 ^a	96 ± 1,7 ^a	214 ± 3,6 ^a	64 ± 2,0 ^a
	CLC-2	72 ± 1,6 ^a	43 ± 1,8 ^a	119 ± 2,2 ^a	96 ± 1,8 ^a	215 ± 3,7 ^a	64 ± 2,0 ^a
T48	C	39 ± 3,1 ^c	18 ± 2,1 ^c	98 ± 3,4 ^b	75 ± 2,7 ^b	191 ± 5,9 ^b	30 ± 2,9 ^c
	CLC-1	57 ± 2,7 ^b	30 ± 2,2 ^b	113 ± 2,5 ^a	87 ± 2,1 ^a	214 ± 3,9 ^a	49 ± 2,7 ^b
	CLC-1,5	65 ± 2,3 ^a	36 ± 2,1 ^a	115 ± 2,3 ^a	90 ± 1,9 ^a	216 ± 3,7 ^a	57 ± 2,4 ^a
	CLC-2	64 ± 2,3 ^a	37 ± 2,1 ^a	117 ± 2,0 ^a	93 ± 1,8 ^a	215 ± 4,1 ^a	57 ± 2,4 ^a

Grupo C (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®]); grupo CLC-1 (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®] + 1 mg de CLC / 120 x 10⁶ de espermatozoides); grupo CLC-1,5 (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®] + 1,5 mg de CLC / 120 x 10⁶ de espermatozoides); grupo CLC-2 (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®] + 2 mg de CLC / 120 x 10⁶ de espermatozoides). T0 (logo após a diluição), T24 (24 horas de refrigeração) e T48 (48 horas de refrigeração).

^{ab}Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (p < 0,0125).

Tabela 3 – Valores médios (%) e erro padrão para integridade de membrana plasmática de espermatozoides refrigerados a 5° C nos momentos T0, T24 e T48 de amostras suplementadas ou não com CLC.

Tempo (h)	C	CLC-1	CLC-1,5	CLC-2
T0	71 ± 2,0	71 ± 2,0	71 ± 2,0	71 ± 2,0
T24	58 ± 2,4 ^b	67 ± 1,9 ^a	68 ± 1,6 ^a	66 ± 1,9 ^a
T48	50 ± 2,4 ^b	60 ± 2,0 ^a	64 ± 1,6 ^a	61 ± 2,0 ^a

Grupo C (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®]); grupo CLC-1 (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®] + 1 mg de CLC / 120 x 10⁶ de espermatozoides); grupo CLC-1,5 (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®] + 1,5 mg de CLC / 120 x 10⁶ de espermatozoides); grupo CLC-2 (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®] + 2 mg de CLC / 120 x 10⁶ de espermatozoides). T0 (logo após a diluição), T24 (24 horas de refrigeração) e T48 (48 horas de refrigeração).

^{ab}Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente (p < 0,0125).

Tabela 4 – Valores médios (%) e erro padrão para MT, MP, RAP e IMP de espermatozoides refrigerados a 5° C e 15° C nos momentos T0 e T24 de amostras suplementadas ou não com CLC.

Parâmetro	T0	T24			
		5° C		15° C	
		C	CLC-1,5	C	CLC-1,5
MT	80 ± 1,6	57 ± 3,6 ^c	76 ± 2,5 ^a	56 ± 4,1 ^c	69 ± 3,0 ^b
MP	41 ± 1,4	27 ± 3,1 ^b	41 ± 2,8 ^a	24 ± 3,4 ^b	33 ± 3,3 ^b
RAP	70 ± 1,7	44 ± 4,6 ^b	66 ± 3,3 ^a	42 ± 4,8 ^b	59 ± 3,9 ^a
IMP	66 ± 1,3	50 ± 2,7 ^b	61 ± 2,2 ^a	49 ± 2,7 ^b	55 ± 2,8 ^{ab}

Grupo C (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®]); grupo CLC-1,5 (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®] + 1,5 mg de CLC / 120 x 10⁶ de espermatozoides). T0 (logo após a diluição), T24 (24 horas de refrigeração).

^{ab}Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente (p < 0,0125).

Tabela 5 – Valores médios e erro padrão para MT, MP, VAP, VCL, VSL e RAP de espermatozoides de garanhões *bad cooler* refrigerados a 5° C nos momentos T0, T24 e T48 de amostras suplementadas ou não com CLC.

Tempo (h)	Grupo	MT (%)	MP (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	RAP (%)
T0	C	76 ± 2,4	44 ± 1,9	122 ± 4,5	97 ± 2,6	219 ± 7,8	68 ± 3,1
T24	C	55 ± 4,5 ^b	28 ± 3,8 ^b	105 ± 5,2 ^b	83 ± 4,2 ^b	199 ± 7,5 ^b	45 ± 4,7 ^b
	CLC-1,5	67 ± 3,3 ^a	38 ± 3,3 ^a	116 ± 3,8 ^a	93 ± 3,1 ^a	212 ± 5,7 ^a	59 ± 3,8 ^a
T48	C	39 ± 4,9 ^b	18 ± 3,3 ^b	98 ± 5,4 ^b	75 ± 4,5 ^b	191 ± 9,7 ^b	30 ± 4,7 ^b
	CLC-1,5	57 ± 4,5 ^a	30 ± 3,5 ^a	113 ± 4,0 ^a	87 ± 3,5 ^a	214 ± 6,4 ^a	49 ± 4,5 ^a

Grupo C (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®]); grupo CLC-1,5 (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®] + 1,5 mg de CLC / 120 x 10⁶ de espermatozoides). T0 (logo após a diluição), T24 (24 horas de refrigeração) e T48 (48 horas de refrigeração).

^{ab}Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (p < 0,0125).

Tabela 6 - Valores médios e erro padrão para MT, MP, VAP, VCL, VSL e RAP de espermatozoides de garanhões *good cooler* refrigerados a 5° C nos momentos T0, T24 e T48 de amostras suplementadas ou não com CLC.

Tempo (h)	Grupo	MT (%)	MP (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	RAP (%)
T0	C	81 ± 1,9	51 ± 2,4	122 ± 4,5	96 ± 3,3	218 ± 7,1	72 ± 2,6
T24	C	69 ± 2,6 ^b	38 ± 2,8 ^b	114 ± 4,2 ^b	94 ± 3,8 ^a	209 ± 5,9 ^a	60 ± 3,3 ^b
	CLC-1,5	79 ± 1,2 ^a	49 ± 2,1 ^a	121 ± 2,8 ^a	102 ± 2,6 ^a	216 ± 4,9 ^a	72 ± 1,6 ^a
T48	C	53 ± 3,8 ^b	29 ± 3,3 ^b	107 ± 4,7 ^b	86 ± 3,8 ^b	200 ± 9,7 ^a	44 ± 4,2 ^b
	CLC-1,5	72 ± 2,6 ^a	46 ± 2,8 ^a	117 ± 3,5 ^a	97 ± 3,3 ^a	214 ± 3,8 ^a	64 ± 3,3 ^a

Grupo C (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®]); grupo CLC-1,5 (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®] + 1,5 mg de CLC / 120 x 10⁶ de espermatozoides). T0 (logo após a diluição), T24 (24 horas de refrigeração) e T48 (48 horas de refrigeração).

^{ab}Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (p < 0,0125).

Tabela 7 – Valores médios (%) e erro padrão para integridade de membrana plasmática de amostras suplementadas ou não com CLC de espermatozoides de garanhões *good cooler* e *bad cooler* refrigerados a 5° C nos momentos T0, T24 e T48.

Garanhão	Tempo (h)				
	T0	T24		T48	
	Controle	Controle	CLC-1,5	Controle	CLC-1,5
<i>Good cooler</i>	73 ± 2,6	64 ± 4,0 ^a	70 ± 3,1 ^a	59 ± 2,4 ^a	67 ± 1,9 ^a
<i>Bad cooler</i>	66 ± 2,8	50 ± 3,1 ^b	64 ± 2,1 ^a	42 ± 4,0 ^b	59 ± 3,1 ^a

Grupo C (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®]); grupo CLC-1,5 (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®] + 1,5 mg de CLC / 120 x 10⁶ de espermatozoides). T0 (logo após a diluição), T24 (24 horas de refrigeração) e T48 (48 horas de refrigeração).

^{ab}Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente (p < 0,0125).

Tabela 8 – Valores médios (%) e erro padrão para reação acrossômica (ACR) de espermatozoides equinos frescos e refrigerados a 5° C por 24 horas antes (Pré - Ca) e após 1 (Ca – 1h), 2 (Ca – 2h) e 3 horas (Ca – 3h) de incubação com cálcio ionóforo a 37° C.

Momento	ACR – fresco		ACR – refrigerado	
	Controle	CLC 1,5	Controle	CLC 1,5
Pré – Ca	30 ± 2,2 ^a	30 ± 2,2 ^a	37 ± 2,9 ^a	32 ± 2,3 ^b
Ca – 1h	55 ± 8,4 ^a	44 ± 5,6 ^a	68 ± 2,8 ^a	47 ± 4,4 ^b
Ca – 2h	77 ± 4,9 ^a	57 ± 6,0 ^b	93 ± 1,9 ^a	87 ± 3,1 ^a
Ca – 3h	88 ± 3,8 ^a	69 ± 6,6 ^b	96 ± 0,9 ^a	90 ± 2,4 ^b

Grupo C (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®]); grupo CLC-1,5 (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®] + 1,5 mg de CLC / 120 x 10⁶ de espermatozoides).

^{ab}Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente (p < 0,05).

Tabela 9 - Taxa de concepção por ciclo (%) do sêmen refrigerado por 24 horas a 5° C de ganhão *good cooler* e *bad cooler* suplementado ou não com CLC.

Grupo	Good cooler	Bad cooler
Controle	80 (8/10) ^a	44 (11/25) ^b
CLC-1,5	80 (8/10) ^a	76 (19/25) ^a

Grupo C (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®]); grupo CLC-1,5 (Sêmen diluído em Botu-Sêmen[®] + 1,5 mg de CLC / 120 x 10⁶ de espermatozoides).

^{ab}Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (p < 0,05).

4. DISCUSSÃO

O processo de refrigeração reduz o catabolismo celular e o crescimento microbiano, garantindo o aumento na longevidade e possibilitando a utilização do sêmen com resultados satisfatórios de fertilidade entre 24 e 48 horas após a colheita [1, 23]. Apesar dos inúmeros benefícios proporcionados, a refrigeração de sêmen equino promove danos irreversíveis e que são prejudiciais para o desempenho da função espermática [3, 4, 5]. Uma opção para aumentar a resistência espermática a baixas

temperaturas é a modificação do teor lipídico da membrana plasmática através da incorporação de CLC [11].

Visando a obtenção da metodologia ideal para a refrigeração de espermatozoides equinos, no experimento 1 foram testadas as concentrações de 1 mg, 1,5 mg e 2 mg de CLC/120 x 10⁶ de espermatozoides. Corroborando com os achados de Kirk et al. [17], Torres et al. [12] e Crespilho et al. [13], independente da dose testada, a suplementação de CLC promoveu a melhora da cinética espermática e da integridade da membrana plasmática após a refrigeração. Todavia, diferente de Torres et al. [12] e Crespilho et al. [13] que utilizaram respectivamente 2,5 mg e 3 mg de CLC/120 x 10⁶ de espermatozoides, no atual experimento os melhores resultados foram obtidos com as doses de 1,5 e 2 mg de CLC/120 x 10⁶ de espermatozoides. Concentrações estas, muito próximas da que é utilizada para a congelação de sêmen equino [10, 11, 16].

Elevados níveis de colesterol presentes na membrana plasmática possuem a capacidade de interferir no processo de capacitação espermática e na ocorrência de reação acrossômica [10, 15, 16]. Portanto, por ser a menor concentração aliada aos melhores resultados, foi optado pelo grupo CLC-1,5 sobre o grupo CLC-2 para a utilização nos demais experimentos deste trabalho.

A refrigeração espermática a 15° C é comumente utilizada na rotina reprodutiva de equinos para transportes de curta distância e também como alternativa aos ganhões *bad cooler* em inseminações até 24 horas após a colheita [9]. Contudo, os trabalhos que estudaram a utilização do CLC na refrigeração espermática de equinos, testaram somente a temperatura de refrigeração de 5° C [12, 13, 17]. No experimento 2 foram comparadas às temperaturas de 5° C e 15° C sobre as características espermáticas utilizando CLC. Apesar da ação benéfica do grupo CLC-1,5 refrigerado a 15° C em

comparação ao grupo controle, ficou nítido que a temperatura de 5° C é a mais adequada para a refrigeração de espermatozoides equinos previamente suplementados com CLC.

Estes resultados ocorreram provavelmente pela melhor preservação das reservas energéticas dos espermatozoides mantidos a 5° C, já que a cada 10° C de queda na temperatura ocorre uma diminuição de 50% na demanda metabólica espermática [24]. Ou seja, os espermatozoides armazenados a 5° C e a 15° C permanecem respectivamente com aproximadamente 10% e 20% de sua atividade metabólica original. Possivelmente seja este o motivo pelo qual após 24 horas o grupo CLC-1,5 refrigerado a 5° C tenha alcançado valores superiores de MT e MP em relação ao grupo CLC-1,5 refrigerado a 15° C (Tabela 4).

O principal fator de influência para a manutenção da qualidade e longevidade de espermatozoides equinos refrigerados é o próprio garanhão [1]. De acordo com Brinsko et al. [8] os mesmos podem ser classificados em *bad cooler* e *good cooler* de acordo com a resistência espermática a baixas temperaturas. Essa enorme variabilidade na qualidade seminal ocorre principalmente pela forma de seleção dos reprodutores na espécie equina, que é baseada principalmente no desempenho em competições esportivas e na genealogia. Com isso, as características reprodutivas praticamente não são levadas em consideração [25].

Nesse sentido, no experimento 3 foi avaliado e comparado o efeito da adição CLC sobre a refrigeração espermática de garanhões *good* e *bad cooler*. Os resultados demonstraram efeito benéfico com a adição de CLC sobre a qualidade espermática em ambos os grupos de reprodutores. Entretanto, confirmando as observações de Kirk et al. [17] para sêmen refrigerado e Moore et al. [11] para sêmen congelado, os garanhões *bad cooler* foram os mais favorecidos com a suplementação de CLC. Após 24 horas de refrigeração a 5° C, os garanhões *bad cooler* apresentaram em média uma redução de

46%, 57% e 24% nos os parâmetros de MT, MP e IMP, respectivamente. Diferentemente, o grupo CLC-1,5 exibiu em média uma queda de apenas 11%, 12% e 3% nos parâmetros de MT, MP e IMP, respectivamente. Características até mesmo superiores ao grupo controle dos garanhões *good cooler* que apresentaram em média uma queda de 15%, 25% e 12% para os mesmos parâmetros.

Embora o arranjo lipídico da membrana dos espermatozoides não tenha sido avaliado neste estudo, sabe-se que a composição da membrana plasmática está intimamente relacionada com a susceptibilidade do espermatozoide à refrigeração e congelção, sendo a relação colesterol/fosfolípido determinante para manutenção da fluidez e estabilidade da membrana a baixas temperaturas [6, 7]. Portanto, os resultados deste estudo sugerem que a taxa de colesterol/fosfolípido da membrana dos garanhões *bad cooler* seja inferior que a dos *good cooler*. Essa característica explicaria a ação notoriamente superior do CLC sobre a refrigeração espermática nos garanhões *bad cooler*, que seriam favorecidos pelo suprimento desse déficit de colesterol da membrana.

O efluxo de colesterol da membrana plasmática é um evento indispensável para o desencadeamento do processo de capacitação espermática [26]. Portanto, apesar do reconhecido efeito crioprotetor do CLC, a presença de altas taxas de colesterol/fosfolípido modifica a capacidade de fertilização do espermatozoide equino [15]. Zahn et al. [10] verificaram que a incorporação de CLC à membrana plasmática foi prejudicial para a fertilidade de sêmen equino criopreservado, com resultados de 25% contra 75% de prenhez por ciclo para os espermatozoides suplementados ou não com CLC, respectivamente.

Tratando-se especificamente da utilização de CLC para a refrigeração de espermatozoides equinos, até então, não haviam relatos de experimentos desenvolvidos

avaliando a influência do mesmo sobre a fertilidade *in vivo*. Diferentemente de Zahn et al. [10], no experimento 5 o tratamento com CLC não gerou nenhum prejuízo à fertilidade do garanhão *good cooler*. Entretanto, um resultado contundente foi observado para o garanhão *bad cooler*, no qual, com a suplementação de CLC foi gerado um incremento de 42% nos índices de fertilidade em relação ao grupo controle, alcançando uma taxa final de 76% de prenhez por ciclo, semelhante ao observado neste experimento em relação ao garanhão *good cooler*.

Com o intuito de sincronizar a presença de espermatozoides viáveis no oviduto com o momento da ovulação, as inseminações artificiais com sêmen equino congelado normalmente são realizadas após a ovulação, em um período máximo de 6 horas [27, 28]. Protocolo diferente deste experimento, em que as inseminações foram realizadas com sêmen refrigerado, 12 a 24 horas antes da ovulação. Por meio da adição de CLC, a membrana espermática adquire uma estabilidade muito grande, modificando a responsividade frente a diferentes indutores de capacitação ou até mesmo gerando a necessidade de um período maior de estímulo para desencadeamento da reação acrossômica [10, 16, 29]. Neste sentido, no experimento 4 verificou-se que somente a partir de duas horas de incubação em meio capacitante, os espermatozoides refrigerados por 24 horas do grupo CLC-1,5 apresentaram valores de reação acrossomal similares aos verificados no grupo controle. Portanto, os resultados de fertilidade obtidos neste trabalho sugerem que houve a uma disponibilidade de tempo adequada no trato reprodutivo feminino que permitiu que os espermatozoides tratados com CLC sofressem a capacitação em tempo hábil para fertilização.

5. CONCLUSÃO

Através deste estudo conclui-se que a suplementação com CLC exerce uma ação crioprotetora sobre espermatozoides equinos de garanhões *bad cooler* e *good cooler* durante a refrigeração por 24 e 48 horas. A concentração de 1,5 mg de CLC/120 x 10⁶ de espermatozoides e a temperatura de 5° C devem ser utilizadas para a obtenção dos melhores resultados com a refrigeração espermática de equinos. A incorporação de CLC causa *in vitro* um atraso de pelo menos uma hora na capacitação de espermatozoides refrigerados que aparentemente não afetou a fertilidade com o manejo reprodutivo adotado, bem como pode proporcionar um incremento nas taxas de fertilidade de garanhões *bad cooler*.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro e a empresa Botupharma[®] pelo fornecimento dos meios diluentes.

6. REFERÊNCIAS

- [1] Aurich C. Recent advances in cooled-semen technology. Anim Reprod Sci 2008, 107: 268-75.
- [2] Graham JK. Cryopreservation of stallion spermatozoa. Vet Clin N Am Equine Pract 1996, 12: 131-47.
- [3] Amann RP, Pickett BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J Equine Vet Sci 1987, 7: 145-73.
- [4] Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. Cryobiology 1992, 29: 255-66.

- [5] Crockett C, Graham JK, Bruemmer JE, Squires EL. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility. *Theriogenology* 2001, 55: 793–3.
- [6] Darin-Bennett A, White IG. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 1977, 14: 466-0.
- [7] Watson PF. The effects of cold shock on sperm cell membranes, in: G.J. Morris, A. Clarke (Eds.), *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*, Academic Press, New York, 1981, pp. 189–18.
- [8] Brinsko SP, Crockett EC, Squires EL. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 2000, 54:129-6.
- [9] Battelier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM et al. Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci* 2001, 68: 181–0.
- [10] Zahn FS, Papa FO, Dell'Aqua JA. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology* 2002, 58: 237-0.
- [11] Moore AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 2005, 51: 241-9.
- [12] Torres P, Serres C, Gómez-Cuétara C, Santiago I, Mateos E, Álvarez AL. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on motility and plasma membrane integrity of cooled stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 2006, 94: 148-1.
- [13] Crespilho AM, Spizziri BE, Meyers M, Graham JK. The Effect of Cholesterol addition, buffer, and pH on equine sperm stored at 5° C. *J Equine Vet Sci* 2013, 33: 663-6.
- [14] Dobziuk H. Molecules with holes – cyclodextrins. In: Dobziuk H. *Cyclodextrins and their complexes*, Weinheim, Germany, 2006, 1-30.

- [15] Brinsko SP, Love CC, Bauer JE, Macpherson ML, Varner DD. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. *Anim Reprod Sci* 2007, 99: 65-1.
- [16] Spizziri BE, Fox MH, Bruemmer JE, Squires EL, Graham JK. Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallion's spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2010, 118: 255-4.
- [17] Kirk ES, Graham JK, Squires EL. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. *Anim Reprod Sci* 2001, 68: 317.
- [18] Purdy PH, Graham JK. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 2004, 48: 36-5.
- [19] Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1990, 88: 343-2.
- [20] Freitas-Dell'Aqua CP, Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Dell'Aqua Jr. JA, Papa FO. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Anim Reprod* 2012, 9:941.
- [21] R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- [22] Wheeler B (2010). lmPerm: Permutation tests for linear models. R package version 1.1-2. <http://CRAN.R-project.org/package=lmPerm>
- [23] Jasko DJ, Hathaway JA, Schaltenbrand VL, Simper WD, Squires EL. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1992, 37: 1241-52.

- [24] Graham JK. Principles of cooled semen. In: McKinnon, A.O., Edward L. Squires, E.L., Vaala, W.E., Varner, D.D. Equine Reproduction, Second Edition, Blackwell Publishing, 2011. p. 1308-5.
- [25] Varner DD, Love CC, Blanchard TL, Bliss SB, Carrol BS, Macpherson ML. Breeding-Management Strategies and Semen-Handling Techniques for Stallions-Case Scenarios. In: Proceedings of the 56th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Baltimore, Maryland, USA, 2010, 56.
- [26] Davis BK. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/ phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. In: Proceedings of the National Academy of Sciences 1981, 78: 7560-4.
- [27] Monteiro GA, Papa FO, Zahn FS, Dellaqua Jr. JA, Melo CM, Maziero RRD, Avanzi BR, Alvarenga MA, Guasti PN. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. Anim Reprod Sci 2011, 127: 197-201.
- [28] Avanzi BR, Ramos RS, Araujo GHM, Fioratti EG, Greco GM, Trinca LA, Dell'Aqua Jr. JA, Melo CM, Papa FO. Influence of insemination time on pregnancy rates of mares inseminated with frozen semen. J Equine Vet Sci 2012, 32: 476-7.
- [29] Oliveira CH, Vasconcelos AB, Souza FA, Martins-Filho AO, Silva MX, Varago FC, Lagares MA. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. Anim Reprod Sci 2010, 118: 194-0.

Capítulo 4

CONCLUSÕES GERAIS

A utilização de CLC aumenta a resistência de espermatozoides equinos à refrigeração, que pode promover a melhora nas taxas de fertilidade de garanhões *bad cooler*.

CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

1. Através das avaliações de cinética espermática e integridade de membrana plasmática verificou-se que a concentração ideal de CLC a ser utilizada para refrigeração é entre 1,5 e 2 mg de CLC/120 x 10⁶ de espermatozoides.
2. As amostras seminais suplementadas com CLC e mantidas sob-refrigeração por 24 horas à 5° C são melhor preservadas que do que aquelas a 15° C.
3. A adição de CLC promove uma melhor preservação da qualidade espermática durante a refrigeração por 24 e 48 horas tanto nos garanhões *good cooler* como nos *bad cooler*. Entretanto, a ação do CLC é maior sobre os garanhões *bad cooler*, nos quais, além das características de cinética, a integridade de membrana também é mais bem preservada após a refrigeração por 24 e 48 horas.
4. A incorporação de CLC promove um atraso no processo de capacitação e reação acrossomal de espermatozoides equinos frescos e refrigerados por 24 horas a 5° C de pelo menos 3 horas e 1 hora, respectivamente.
5. A suplementação com CLC promoveu um aumento da fertilidade do garanhão *bad cooler*, o qual obteve uma taxa de prenhez por ciclo semelhante ao do garanhão *good cooler*.

Anexos

ANEXO 1 - PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

SOLUÇÃO DE ESTOQUE

SOLUÇÕES	CONSTITUINTES	QUANTIDADE
<i>Estoque IP</i>	Iodeto de Propídeo ¹	10 mg
	Solução fisiológica	20 mL
<i>Estoque CFDA</i>	Diacetato de carboxifluoresceína ²	9,2 mg
	DMSO	20 mL
<i>Estoque de Formaldeído</i>	Formalina a 40%	1 mL
	Solução fisiológica	79 mL
<i>Estoque de Citrato de Sódio</i>	Citrato de sódio 3g	3 g
	Solução fisiológica 100mL	100 mL

1 - P 4170 - Sigma

2 - C 5041 – Sigma

SOLUÇÃO DE TRABALHO

SOLUÇÕES	QUANTIDADE
Solução de Citrato de Sódio	96 mL
Solução de formaldeído 10µL	10 µL
Solução de Iodeto de Propídeo 10µL	10 µL
Solução de Carboxifluoresceína 20µL	20 µL

ANEXO II - PREPARO DO MEIO CAPACITANTE

SOLUÇÃO DE TRABALHO

SOLUÇÕES	QUANTIDADE
Dimetilsulfóxido ¹	1 mL
Cálcio ionóforo ²	5 mg

1 – D 2650 - Sigma

2 - C 7522 – Sigma

ANEXO III – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA *THERIOGENOLOGY* – ISSN 0093-691X

• THERIOGENOLOGY - GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of article

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Technical Notes

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Technical Notes are concise, comprehensive descriptions of technical aspects of innovative methods (that will not be subsequently published as a full-length paper). The entire submitted manuscript typically should not exceed approximately 12 double-spaced pages.

Page Charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>

Policy and Ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)* for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Theriogenology*.

Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>

Submission Declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under current consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition, analysis and interpretation of data; (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to Authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are

not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript, together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles (including abstracts) for internal circulation within their institutions. However, permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>).

Retained Author Rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details see <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the Funding Source

You are requested to identify the source(s) of financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in writing the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement, this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Open Access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

2. Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY NC SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Creative Commons Attribution (CC-BY): available only for authors funded by organizations with which we have established an agreement with. For a full list please see www.elsevier.com/fundingbodies

Elsevier has established agreements with funding bodies. This ensures authors can comply with funding body Open Access requirements, including specific user licenses, such as CC-BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. www.elsevier.com/fundingbodies

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The Open Access publication fee for this journal is \$USD 2,500, excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy

www.elsevier.com/openaccesspricing

Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors, whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies, please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please

visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online; you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail, removing the need for a paper trail. Submit your article. Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/therio>.

Referees

Please submit, as part of the covering letter with the manuscript, the names, full affiliations (department, institution, city and country) and e-mail addresses of 3 potential Referees. Appropriate Referees should be knowledgeable about the subject, but have no close connection with any of the authors. You may also suggest reviewers you do not want to review your manuscript, but please state your reasons for doing so.

PREPARATION

Use of word-processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format and double spaced. It is important that all pages and lines are numbered. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts, etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the word processor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. In lieu of a grid, use tabs, not spaces, to align columns. Electronic text should be prepared similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file; instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your word processor, and to read it critically.

Article Structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1. (then 1.1.1., 1.1.2., ...), 1.2., etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line, with one blank line above and below.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Introduction should generally not exceed 2 manuscript pages (double-spaced).

Materials and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published in a readily available source should be indicated by a reference (only relevant modifications should be described).

Results

Results should be clear and concise. If data are reported in a table or figure, the text should only highlight the information, but not repeat it in detail.

Discussion

This should explore the relevance and implications of the results of the work, not simply repeat them. A combined Results and Discussion section may be appropriate. Avoid excessive citations and discussion of published literature. Although there are always exceptions, in general the Discussion section should generally not exceed 40% of the manuscript (excluding references, figures, and tables) and there should be no more than 35 references (except for review papers).

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or a Results and Discussion section.

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations, trade names, and formulae.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. First names or initials can be used according to author preference. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of review and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Some keywords may be identical to words used in the title, but consideration should be given to keywords which are complimentary to words used in the title (to facilitate retrieval of your article from electronic databases). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field should be used. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). Please see *Additional Style Notes* below.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text,

and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Image manipulation

Although it is generally accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. Avoid excessively large fonts.
 - For labels on figures, both those on the figure axes as well as those directly on the figure, capitalize only the first letter of the first word.
 - Do not prepare a figure to communicate very limited data that could easily be included in the text of the Results.
 - Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
 - Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
 - Number the illustrations according to their sequence in the text.
 - Use a logical naming convention for your artwork files.
 - Provide captions to illustrations separately.
 - Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g.,
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites), regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **Information regarding the cost of color reproduction in print will be sent by Elsevier after your article has been accepted.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Since technical complications can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version, should you not opt for color in print), if you have any figures with color that will not be published in color in the printed version, please submit two versions (color and usable black and white).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Present incidental graphics not suitable for mention as figures, plates or schemes at the end of the article and number them "Graphic 1", etc. Their precise position in the text can then be indicated. See further information under Electronic artwork. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left, but such embedding should not be done specifically for publishing purposes. Further, high-resolution graphics files must be provided separately.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: "...as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result..."

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they first appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. J Sci Commun 2010;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E Publishing Inc; 2009, p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors, the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details, you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927-34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Do not abbreviate a journal name which is a single word, or is in a language other than English.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer authors additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips, etc. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. To ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Additional style notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 &Mg;g im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

AI	ANOVA	ADP	ATP	BSA
cAMP	CL	DEAE-cellulose	DMSO	DNA
eCG	EDTA	EGF	ELISA	FSH
GH	GnRH	hCG	HEPE	ShMG
IVC	IVF	IVM	LH	MOET
MSH	mRNA	NAD	NADH	PBS
PGF _{2α}	PGFM	PIPES	PRID	PRL
RIA	RNA	SDS-PAGE	SCNT	TRH
TRIS	tRNA	TSH		

Units of Measure

cpm - counts per min
 dpm - disintegrations per min
 g - gram
 ga - gauge of hypodermic needle
 h - hour
 kg - kilogram
 L - liter

mL - milliliter
 µL - microliter
 m - meter
 min - minute
 mo - month
 s - second
 v:v - volume ratio
 wk - week
 wt/vol - weight per volume
 y - year

Routes of treatment

id - intradermal
 im - intramuscular
 iu - intrauterine
 iv - intravenous
 sc - subcutaneous
 po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance
 CV - coefficient of variation
 df - degrees of freedom
 F - variance ratio
 NS - not significant
 P - probability
 SD - standard deviation
 SEM - standard error of the mean
 r - correlation coefficient
 r^2 - coefficient of regression

Additional information

- For issues of style and format not addressed here, please consult Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the CBE Manual or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

Submission Checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details regarding any item.

Ensure that the following items are present:

- One author has been designated as the corresponding author with contact details:
- E-mail address

- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' (and critically read and reviewed)
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information.

The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address, then paper proofs will be sent by post), or a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are on the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please

list your corrections quoting line number. If this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and send by e-mail or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that if no response is received, Elsevier may proceed with publication of your article.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

Updated January 2012